

PCT

E.P.



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

| | | |
|----------------------------|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 TP-97060 | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。 | |
| 国際出願番号 PCT/JP98/00370 | 国際出願日 (日.月.年) 29.01.98 | 優先日 (日.月.年) 29.01.97 |
| 出願人(氏名又は名称) 東レ株式会社 | | |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

- ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。
- ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。
- ☒ この国際出願は、ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。
 - ☐ この国際出願と共に提出されたもの
 - ☒ 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの
 - ☐ しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を越える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない
 - ☐ この国際調査機関が書換えたもの
- 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。
- 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。
- 要約書とともに公表される図は、
 第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C07K14/705, C12N15/12, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C07K14/705, C12N15/12, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DERWENT), WPI(DERWENT), GenBank/EMBL(gene seq)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|-------------------------------|
| Y | WO, 92/13559, A1 (PROGENICS PHARMACEUTICALS, INC.) 20.8月.1992(20.08.92) & AU, 9214385, A | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | WO, 95/02421, A1 (ALKERMES INC.) 26.1月.1995(26.01. 95) (ファミリーなし) | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | JP, 6-87899, A (学校法人藤田学園) 29.3月.1994 (29.03.94) & EP, 466505, A2 & US, 5475100, A | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | Nucleic Acids Res., Vol.10, No.13(1982) J.W.Ellison et al; "The nucleotide sequence of a human immunoglobulin C ₁ gene" p.4071-4079 | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.06.98

国際調査報告の発送日

16.06.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝本 晶子

4B

9452

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

THIS PAGE BLANK (USPTO)

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|-------------------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | Cell, Vol. 29, No. 2 (1982) N. Takahashi et al. ; "Structure of human immunoglobulin gamma genes: implications for evolution of gene family", p. 671-679 | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | EMBO J., Vol. 8, No. 5 (1989) Y. Takada et al. : "The primary structure of the α^4 subunit of VLA-4: homology to other integrins and a possible cell-cell adhesion function", p. 1361-1368 | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | Mol. Immunol., Vol. 32 (1995) M. C. Szabo et al. ; "Identification of two variants of the human integrin α^4 subunit", p. 1453-1454 | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | J. Cell Biol. Vol. 105 (1987) W. S. Argraves et al. ; "Amino acid sequence of the human fibronectin receptor", p. 1183-1190 | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | US, 5 5 1 6 6 3 4, A (Newman P. J.) 14. 5月. 1996 (14. 05. 96) (ファミリーなし) | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | J. Cell Biol., Vol. 109 (1989) Y. Takada et al. ; "The primary structure of the VLA-2/collagen receptor α^2 subunit (platelet GPIa): homology to other integrins and the presence of a possible collagen-binding domain", p. 397-407 | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | J. Clin. Invest., Vol. 92 (1993) S. Santoso et al. ; "The human platelet alloantigens Br ^a and Br ^b are associated with a single amino acid polymorphism on glycoprotein Ia (Integrin subunit α^2)", p. 2427-2432 | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| X/Y | J P, 7-5 0 0 7 2 1, A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニヴァーシティー オブ カリフォルニア) 26. 1月. 1995 (26. 01. 95) & WO, 9 2 / 1 2 2 3 6, A 1 | 39/37-38, 43, 44 |
| X/Y | J P, 5-5 0 5 1 7 9, A (ラ ホヤ キャンサー リサーチ ファウンデーション) 5. 8月. 1993 (05. 08. 93) & WO, 9 1 / 0 9 8 7 4, A & EP, 5 0 7 8 3 6, A & US, 5 1 6 9 9 3 0, A | 39/37-38, 43, 44 |
| Y | J P, 5-5 0 2 2 2 8, A (スクリップス クリニック アンド リサーチ ファウンデーション) 22. 4月. 1993 (22. 04. 93) & WO, 9 1 / 0 7 9 7 7, A & EP, 5 0 2 1 2 4, A & US, 5 1 9 6 5 1 1, A | 26-36, 42 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)



| | | |
|--|-----------|--|
| (51) 国際特許分類6 C07K 14/705, C12N 15/12, G01N 33/50 | A1 | (11) 国際公開番号 WO98/32771 (43) 国際公開日 1998年7月30日(30.07.98) |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP98/00370 (22) 国際出願日 1998年1月29日(29.01.98) (30) 優先権データ 特願平9/15118 1997年1月29日(29.01.97) JP 特願平9/234544 1997年8月29日(29.08.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 東レ株式会社(TORAY INDUSTRIES, INC.)[JP/JP] 〒103 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 戒能美枝(KAINOH, Mie)[JP/JP] 〒251 神奈川県藤沢市藤沢633番地1号201 Kanagawa, (JP) 田中利明(TANAKA, Toshiaki)[JP/JP] 〒249 神奈川県逗子市沼間1丁目11番24号 Kanagawa, (JP) | | (81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前であり、補正番受領の際には再公開される。 |
| (54)Title: CHIMERIC PROTEINS, HETERODIMER COMPLEXES THEREOF AND SUBSTITUTE FOR PLATELET (54)発明の名称 キメラ蛋白質、そのヘテロダイマー複合体、および血小板代替物 (57) Abstract Integrin-immunoglobulin chimeric protein heterodimer complexes in which the α -chain and β -chain of integrins have been associated in a stable state. These complexes are not only usable as drugs as such but also applicable to the assaying of binding of integrins to ligands and the detection of substances binding to integrins or those inhibiting binding of integrins to ligands. These complexes are also usable as diagnostic agents. It has been found that integrins isolated in a stably associated structure would bind to extracellular matrixes under physiological conditions in the presence of plasma components, which indicates that integrins and, in its turn, extracellular matrix receptors might be usable as substitutes for platelets. | | |

(57) 要約

本発明は、インテグリンの α 鎖と β 鎖とが安定に会合したインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を提供する。得られたインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体はそのまま医薬として利用可能であるばかりでなく、インテグリンとリガンドの結合の測定、インテグリンに結合する物質やインテグリンとリガンドの結合を阻害する物質の探索に利用できる。さらには診断薬にも利用できる。

さらに、構造を安定に会合させて単離したインテグリンが、生理条件下および血漿成分存在下で細胞外マトリックスに結合することを見出した。これによりインテグリン、ひいては細胞外マトリックスレセプターの血小板代替物としての用途を見出した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

| | | | | | | | |
|----|--------------|----|---------|----|----------|----|-------------------|
| AL | アルバニア | FR | フランス | LT | リトアニア | SN | セネガル |
| AM | アルメニア | GB | イギリス | LU | ルクセンブルグ | SD | スーダン |
| AT | オーストリア | DE | ドイツ | LV | ラトヴィア | DG | ジブチ |
| AZ | アゼルバイジャン | EE | エストニア | MC | モナコ | TJ | タジキスタン |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GG | ギリシャ | MD | モルドバ | TM | トルクメニスタン |
| BB | バハマ | GM | ギニア | MG | マダガスカル | TR | トルコ |
| BE | ベルギー | GN | ギニア・ビサウ | MK | マケドニア共和国 | TT | トリニダード・トバゴ |
| BG | ブルガリア | GW | ギニア・ビサウ | ML | マリ | TC | タークス・カイコス諸島 |
| BJ | ベナン | GR | ギリシャ | MN | モンゴル | UA | ウクライナ |
| BY | ベラルーシ | HU | ハンガリー | MR | モーリタニア | AG | アンティグア・バーブーダ |
| CA | カナダ | IE | アイルランド | MX | メキシコ | GS | 南ジョージア |
| CC | ココス（キリング）諸島 | IL | イスラエル | NE | ニジェール | SZ | スワジランド |
| CD | コンゴ民主共和国 | IT | イタリア | NL | オランダ | VC | セント・ビンセント・グレナディーン |
| CF | 中央アフリカ共和国 | JP | 日本 | NO | ノルウェー | VG | ヴァージン諸島 |
| CG | コンゴ共和国 | KE | ケニア | NZ | ニュージーランド | WU | ウーロン |
| CH | スイス | KR | 韓国 | PL | ポーランド | YE | イエメン |
| CI | コートジボワール | KG | キルギス | PT | ポルトガル | ZW | ジンバブエ |
| CK | クック諸島 | PR | プエルトリコ | RO | ルーマニア | | |
| CL | チリ | RU | ロシア | SE | スウェーデン | | |
| CN | 中国 | CZ | チェコ | SG | シンガポール | | |
| CO | コロンビア | DK | デンマーク | SK | スロバキア | | |
| CZ | チェコ | EE | エストニア | SL | シエラレオネ | | |
| DE | ドイツ | ES | スペイン | | | | |
| EE | エストニア | | | | | | |

明細書

キメラ蛋白質、そのヘテロダイマー複合体、および血小板代替物

技術分野

本発明は、インテグリンと免疫グロブリンのキメラ蛋白質、そのヘテロダイマー複合体、その製造方法、その医薬および試薬としての用途等に関する。さらに、本発明はインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体をはじめとする、単離した細胞外マトリックスレセプターの血小板代替物としての医薬用途に関する。

背景技術

種々の細胞は細胞と細胞の間の接着を媒介するレセプターや細胞と細胞外マトリックスの接着を媒介するレセプターを有し、それらのレセプターが免疫・炎症反応、発生、形態形成、創傷治癒、止血、癌転移などに重要な役割を果たしている。これらの現象に関与するレセプターを分離、同定した結果、いわゆる細胞接着分子の存在が明らかにされた。次々と同定される分子の多くは、その構造的特徴から、インテグリンスーパーファミリー、免疫グロブリンスーパーファミリー、セレクトインファミリー、カドヘリンファミリーなどに分類されている (Corliss, T. M. and Harlan, J. M. Blood 84, 2068-2101 (1994))。これらのファミリーのうち、免疫グロブリンスーパーファミリー、セレクトインファミリー、カドヘリンファミリーが、主に細胞間の接着を媒介するのに対し、インテグリンスーパーファミリーは、ファイブロネクチンやコラーゲンなどの細胞外マトリックスへの接着を媒介する、いわゆる細胞外マトリックスレセプターである。この他に、いずれの接着分子のファミリーにも属さない細胞外マトリックスレセプターとして、CD26 (DDP IV)、CD44、G P IV、G P VI、G P Ib-vWFなどがあげられる。CD26はコラーゲン、CD44はヒアルロン酸、ファイブロネクチンやコラーゲンのレセプターである (「接着分子」p32-42、宮坂昌之 (1991) メジカルビュー社)。また血小板上に存在する膜糖蛋白質 (GP) のうち、G P IV、G P VI、G P Ib-vWFなども、コラーゲンレセプターであることが報告されている (「血小板受容体」p119-132、

大熊稔ら（1992）金芳堂）。

インテグリンスーパーファミリーに属するレセプターは、互いに異なる膜蛋白質である α 鎖と β 鎖の2つのサブユニットが非共有結合により会合したヘテロダイマー複合体構造を持つ（Hynes, R. O. Cell 48, 549-554（1987））。当初、インテグリンスーパーファミリーに属する分子は、共有する β 鎖の種類により β 1インテグリン、 β 2インテグリン、 β 3インテグリンの3つのサブファミリーに分類されていたが、その後新しい β 鎖、 α 鎖が次々と見つかり、現在では8種類の β 鎖（ β 1、 β 2、 β 3、 β 4、 β 5、 β 6、 β 7、 β 8）、15種類の α 鎖（ α 1、 α 2、 α 3、 α 4、 α 5、 α 6、 α 7、 α 8、 α 9、 α v、 α L、 α M、 α X、 α IIb、 α E）が同定されている（Elner, S. G. and Elner, V. M. Inv. Ophthal. Vis.Sci. 37, 696-701（1996））。それぞれの β 鎖は1種から8種の α 鎖と会合することが知られており、その結果21種類の α 鎖と β 鎖のペアすなわちインテグリン分子が今までに同定されている（Elner, S. G. and Elner, V. M. Inv. Ophthal. Vis.Sci. 37, 696-701（1996））。この中には、医薬品開発のターゲットとなっている α 4 β 1（VLA-4、 β 1インテグリン）、 α L β 2（LFA-1、 β 2インテグリン）、 α M β 2（Mac-1、 β 2インテグリン）、 α IIb β 3（GP IIb/IIIa、 β 3インテグリン）などが含まれている（Drug and Market Development 6, 201-205（1995））。他のインテグリンにも疾患との関連が予想されるものが多い。

インテグリンの持つヘテロダイマー複合体構造は、リガンドとの結合において重要な役割を果たしている（Hynes, R. O. Cell 48, 549-554（1987））。例えば、インテグリン上のリガンド結合部位は α 鎖と β 鎖の両方から構成されると推定されている（Hynes, R. O. Cell 69, 11-25（1992））。同じ α 鎖を持ち異なる β 鎖と会合しているインテグリン、あるいは同じ β 鎖を持ち異なる α 鎖と会合しているインテグリンの基質特異性がそれぞれ異なる（Elner, S. G. and Elner, V. M. Inv. Ophthal. Vis.Sci. 37, 696-701（1996））という事実は、この推測を支持している。一方、一部のインテグリンの α 鎖はその分子中に約180アミノ酸からなる1ドメインと呼ばれる配列を挿入していることが報告されているが、この1ドメインだけでリガンドに結合しうることを示唆するデータが報告された（Ueda, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 10680-10684（1994））。

しかしながら、 α 鎖のIドメインと元のヘテロダイマー複合体であるインテグリンとはリガンドへの結合の様式が異なっていることも同時に示されている (Kamata, T. and Takada, Y. J. Biol. Chem. 269, 26006-26010 (1994))。またリガンドに対する特異性、親和性などのパラメーターが同一かどうかは明らかにされていない。Iドメインを含まないインテグリン、例えば $\alpha 4 \beta 1$ の場合、部分構造だけでリガンドに結合するという報告はない。

インテグリンをそのヘテロダイマー複合体構造を維持し、従ってリガンド結合能を保持したまま単離・調製することができれば、自然に近い状態でのリガンドへの結合様式を検討するために有用である。さらに、そのまま医薬品として用いることができるだけでなく、組織や血清中のリガンド量を測定するための試薬として利用したり、接着阻害化合物を探索する際の材料とするなどきわめて有用である。しかしながら、インテグリンをその機能を保持したまま単離・調製することは非常に難しいとされている。その理由として、前述のようにインテグリンの α 鎖と β 鎖の会合が非共有結合のみで維持されているため、単離・調製途中でこの結合が容易に解離してしまうことが上げられる。インテグリンが膜蛋白質であるため可溶化の際に界面活性剤などを用いる必要のあることが複合体解離の大きな要因と考えられる。言い換えると、非共有結合によって機能構造が維持されている点はその調製を阻んでいる要因である。

上述のように困難ではあるものの、これまでにインテグリンヘテロダイマー複合体を機能を保ったまま単離・精製した例がいくつか報告されている。 $\alpha 2 \beta 1$ 、 $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 3$ の例では、親和性カラムクロマトグラフィーを用いて精製したインテグリンをリポソームに取り込ませることにより、リガンドへの結合が測定できることが示されている (Santoro, S. A. et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 153, 217-223 (1988)、Pytela, R. et al. Cell 40, 191-198 (1985)、Pytela, R. et al. Method. Enzymol 144, 475-489 (1987))。別の例では、精製した $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 3$ をプレートに固相化することによりそれらのインテグリンを介する細胞接着を阻害するペプチドを選択できることが示されている (Kivunen, E. et al. J. Biol. Chem. 268, 20205-20210 (1993)、Healy, J. M. et al. Biochemistry 34, 3948-3955 (1995))。さらに別の例では、精製した $\alpha v \beta 3$ または $\alpha 4 \beta 1$ をプレートに固相化することによりリガンドとの結合が

測定できることが示されている (Charo, I. F. et al. J. Cell Biol. 111, 2795-2800 (1990)、Makarewicz, R. et al. J. Biol. Chem. 269, 4005-4011 (1994)、Paul Mould, A. et al. J. Biol. Chem. 269, 27224-27230 (1994))。別の例では、遺伝子操作の手法を用いて調製した細胞外部分だけからなる $\alpha 11b \beta 3$ ヘテロダイマー複合体を、複合体特異的な抗体を介してプレートに固相化させることによりリガンドとの結合を測定できることが示されている (Gulino, D. et al. Eur. J. Biochem. 227, 108-115 (1995))。これらの例は、精製したインテグリンの機能を発揮させる際に、そのヘテロダイマー複合体を何らかの担体に結合または内包させる必要があることを示している。担体が必要な理由として、ヘテロダイマー複合体が非共有結合で会合しているため溶液中で解離し、その結果機能的な構造を維持できないことが考えられる。最後の例では、複合体特異的な抗体を用いてヘテロダイマー複合体構造を持つ分子のみを選択し、両鎖が解離しない状態で結合を測定する工夫がなされている。

担体を必要としない例として、精製された $\alpha 1 \beta 1$ または $\alpha 2 \beta 1$ が担体を利用しなくても高濃度の金属イオン依存的なリガンドとの結合を測定できる例が報告されている (Pfaff, M. et al. Eur. J. Biochem. 225, 975-984 (1994))。この場合には精製過程で含まれる界面活性剤がリポソームと類似の役割を果たし担体として働いていると考えられる。さらに別の例として、遺伝子操作の手法を用いて調製した細胞外部分だけからなる $\alpha M \beta 2$ ヘテロダイマー複合体がリガンドに結合することが示されている (Berman, P. W. et al. J. Cell Biochem. 52, 183-195 (1993))。これらの例では、前記のような担体の必要性は示されていないが、ヘテロダイマー複合体分子間の会合は非共有結合のみで維持されている点は改善されていない。

また他の例として αd と免疫グロブリンのキメラ蛋白質が開示されているが (特表平 8-507933)、免疫沈降の結果しか示されておらず、リガンドへの結合は調べられていない。また、 β 鎖を同時に免疫グロブリンとのキメラ蛋白質として発現したわけではないので、 α 鎖と β 鎖の間の結合は非共有結合のままである。

以上の事実は、未だかつて、インテグリンの α 鎖 β 鎖を構造的に安定に会合させ機能を維持したまま調製した例がないことを示している。複合体構造が不安定

であることは、その分子の利用を制限するものである。

インテグリンスーパーファミリーに属する分子のうち、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ は、長期間活性化したT細胞や血小板などに発現していることが見出された細胞外マトリックスレセプターである。ただし、血小板や線維芽細胞の細胞表面にある $\alpha 2 \beta 1$ は、コラーゲンのみに結合し、血管内皮細胞表面にある $\alpha 2 \beta 1$ は、コラーゲン、ラミニンのいずれにも結合することが報告されており (Elices, M. J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9906-9910 (1989))、細胞に依存して $\alpha 2 \beta 1$ の機能が異なると推定されている。

病態との関連において、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ は創傷治癒や癌転移に重要な役割を果たすことを示唆する報告がある (Schirow, J. A. et al. Cell 67, 403-410 (1991)、Chen, F. et al. J. exp. Med. 173, 1111-1119 (1991)、Chan, B. M. C. et al. Science 251, 1600-1602 (1991))。さらに、出血傾向を呈する患者の血小板機能解析からインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ を介する血小板とコラーゲンの粘着が、止血・血栓形成過程の第一ステップに深くかかわっていることが示された (Nieuwenhuis, H. K. et al. Nature 318, 470-472 (1985))。この様にインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ と病態との関連が示唆されてはいるものの、生理的イオン条件下あるいは血漿成分存在下での使用を前提として、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ 蛋白質をはじめとする単離した細胞外マトリックスレセプター蛋白質を用いる医薬用途は検討されていなかった。

一方、臨床現場では血液製剤として用いられている血小板の人工的な代替物の必要性が高まっており、種々の試みが報告されているが (医学のあゆみ 179, 406-407 (1996)、臨床血液 37, 1353-1361 (1997))、実用化には至っていない。

発明の開示

本発明は、インテグリンの α 鎖と β 鎖をそれぞれ免疫グロブリンの重鎖または軽鎖と連結させたキメラ蛋白質、そのヘテロダイマー複合体、その製造方法、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とリガンドおよび細胞との結合を試験する方法、その方法を用いて得られるインテグリンに結合する物質、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を用いるインテグリンとリガンドの結合を阻害する物質の探索方法および結合を阻

害する物質、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の医薬および試薬としての用途である。さらに、本発明はインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体をはじめとする、単離した細胞外マトリックスレセプターを有効成分とする血小板代替物である。

図面の簡単な説明

図1は $\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体がVCAM-1発現細胞に結合すること、この結合が抗インテグリン抗体と陽イオンキレート剤であるEDTAにより阻害されることを示す。

図2は $\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体がCS-1ペプチドに結合し、この結合が抗インテグリン抗体と陽イオンキレート剤であるEDTAにより阻害されることを示す。

図3は $\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とCS-1ペプチドとの結合が、GPEILDVPSTにより阻害され、他のペプチドでは阻害されないことを示す。

図4は $\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体がコラーゲンに結合し、この結合が抗インテグリン抗体と陽イオンキレート剤であるEDTAにより阻害されることを示す。

図5は $\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームが、血漿存在下でコラーゲンに結合することを示す。

図6は血漿存在下における $\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームのコラーゲンへの結合が、抗インテグリン抗体、陽イオンキレート剤であるEDTAにより阻害されることを示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明で述べる細胞外マトリックスレセプターとは、細胞と細胞外マトリックスの接着を媒介するレセプター群の総称である。このレセプター群には、 α 鎖と β 鎖の2つの膜蛋白質が非共有結合により会合したヘテロダイマー複合体構造からなるインテグリンスーパーファミリー (Corliss, T. M. and Harlan, J. M. Blood 84, 2068-2101 (1994)) と、その他のレセプター、例えばCD26 (DDP IV)、C

D44、GPIV、GPIV、GPIb-vWFなどが含まれる。さらに本発明で述べるインテグリンとは、インテグリンスーパーファミリーに属する分子を指し、このファミリーに属する分子の変異体も含まれるものとする。本発明の α 鎖としては、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ 、 $\alpha 8$ 、 $\alpha 9$ 、 αv 、 αL 、 αM 、 αX 、 αIIb 、 αE の15種類が含まれ、中でも $\alpha 4$ 、 $\alpha 2$ が好ましいが、特にこれに限定されるものではない。また、 β 鎖としては $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 6$ 、 $\beta 7$ 、および $\beta 8$ の8種類が含まれ、中でも $\beta 1$ が好ましいが、特にこれに限定されるものではない。また、 α 鎖と β 鎖のペアからなるインテグリン分子としては、Elner, S. G. and Elner, V. M. *Inv. Ophtal. Vis. Sci.* 37, 696-701 (1996)に記載の21種類が含まれるが、特にこれに限定されるものではない。

インテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質とは、インテグリンの α 鎖の細胞外領域が免疫グロブリンを構成する重鎖あるいは軽鎖の定常領域と結合した分子を指す。この場合、蛋白質のN末端側にインテグリン分子、その後に免疫グロブリン分子が並ぶようなキメラ蛋白質が好ましい。インテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質とは、インテグリンの β 鎖の細胞外領域が免疫グロブリンを構成する重鎖あるいは軽鎖の定常領域と結合した分子を指す。この場合も蛋白質のN末端側にインテグリン分子、その後に免疫グロブリンが並ぶようなキメラ蛋白質が好ましい。 α 鎖と β 鎖のいずれの場合にも免疫グロブリンの重鎖と結合したキメラ蛋白質が好ましい。

また α 鎖あるいは β 鎖と結合させる免疫グロブリンのアイソタイプは特に限定されるものではない。IgG、IgM、IgA、IgEのいずれも利用しうるが、IgGを用いることが好ましい。IgGのサブクラスとしては、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄があるが、IgG₁を用いるのが好ましい。さらに免疫グロブリンの代わりに分子間にジスルフィド結合を有するダイマー構造の分子を利用することも可能である。

本発明では、インテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質とインテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質が会合してなる分子をインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と呼ぶ。このとき α 鎖・免疫グロブリン重鎖（ α 鎖と免疫

グロブリン重鎖のキメラ蛋白質の意、他も同様)と β 鎖・免疫グロブリン重鎖、 α 鎖・免疫グロブリン重鎖と β 鎖・免疫グロブリン軽鎖、 α 鎖・免疫グロブリン軽鎖と β 鎖・免疫グロブリン重鎖の組み合わせが好ましい。より好ましくは α 鎖・免疫グロブリン重鎖と β 鎖・免疫グロブリン重鎖の組み合わせである。

具体的には、本発明のインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体は、 α 鎖が $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ 、 $\alpha 8$ 、 $\alpha 9$ 、 αv 、 αL 、 αM 、 αX 、 αIIb 、または αE であるものが挙げられる。また、 β 鎖としては $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 6$ 、 $\beta 7$ 、または $\beta 8$ であるものが挙げられる。好ましくは α 鎖が $\alpha 4$ または $\alpha 2$ であり、 β 鎖が $\beta 1$ であるが、特にこれに限定されるものではない。

以下にインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の調製方法を述べるが、これに限定されるものではない。

インテグリンの α 鎖および β 鎖を暗号化するDNAを得るには、公知のcDNA配列の情報を利用して、PCR法による遺伝子増幅、cDNAクローニング、DNA合成などの方法を利用する。例えば $\alpha 4$ および $\beta 1$ のDNA配列はすでに文献に報告されている (Takada, Y. et al. EMBO J. 8, 1361-1368 (1989)、Scott Argraves, W. et al. J. Cell Biol. 105, 1183-1190 (1987))。インテグリンの α 鎖と β 鎖を暗号化するDNAを得る別の方法として、抗体を利用する発現クローニングなども利用する。免疫グロブリンの定常領域を暗号化するDNAと結合するために、インテグリンの α 鎖と β 鎖の細胞外部分のみを暗号化するDNAを取り出すことが望ましい。そのためには、PCR法およびDNA合成法を用いることが好ましい。ここでいう細胞外部分とは、 α 鎖と β 鎖いずれの場合にも膜貫通部分と予想されている部分よりN末端側のポリペプチド配列を指す。リガンドとの結合能が維持されればその部分配列を用いることも可能であるが、細胞外領域と考えられている部分の大部分を用いることが好ましい。DNAを取り出す際には、免疫グロブリンを暗号化するDNAと連結した後にフレームが合うように調整を加えておく必要がある。例えば、PCR法によりDNA断片を取り出す場合にはプライマーに変異を加えることによりこれを達成する。この場合、プライマーの塩基置換によりアミノ酸変異がおきないように設計することが望ましい。ただしキメラ蛋白質の機能に変化を与えない範囲でのアミノ酸置換は

許容しうる。化学合成によりDNAを得る場合には、免疫グロブリンを暗号化するDNAと連結し得るように配列を設計しておくことで目的を達する。cDNAの場合には、DNAの切断と合成DNAを利用して、免疫グロブリンを暗号化するDNAと結合できるDNAを調製しうる。

次に免疫グロブリンを暗号化するDNAを調製する。本発明においてはヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖を暗号化するDNAを用いることが望ましいが、他の動物種の免疫グロブリンを暗号化するDNAも利用しうる。ヒトIgGを暗号化するDNAの調製例はすでに報告されているが（Ellison, J. W. et al. *Nucleic Acids Res.* 10, 4071-4079 (1982)）、これに限定されるものではない。前述のインテグリン α 鎖、 β 鎖を暗号化するDNAの調製と同様の方法を利用してもよい。本発明においてはヒト免疫グロブリン重鎖として、ゲノムDNAを用いることが好ましいが、cDNAを用いてもよい。ヒト免疫グロブリン重鎖のDNAとしては、ヒンジ領域、CH2領域、CH3領域を暗号化する部分を用いることが好ましいが、CH1～CH3の定常領域全体を暗号化するDNAを利用してもよい。免疫グロブリン軽鎖の場合にはCL領域を暗号化するDNAを用いる。最終的に α 鎖あるいは β 鎖の細胞外部分を暗号化するDNAとヒト免疫グロブリン重鎖の定常領域を暗号化するDNAをフレームをあわせて連結する。得られたDNAは翻訳開始のメチオニンに始まって、インテグリンの α 鎖または β 鎖のシグナル配列、その細胞外領域、ヒト免疫グロブリン重鎖の定常領域をこの順に連結したポリペプチドを暗号化する。

上記で得られたインテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質を暗号化するDNA、あるいはインテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質を暗号化するDNA、をそれぞれ適当な発現制御配列に機能的に連結し、組み換えベクターを得る。組み換えベクターの作製方法、細胞への導入方法、など一般的な遺伝子組み換えに関する方法は成書に記載されているが（"Molecular Cloning" Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Lab. Press, New York）、これに限定されるものではない。本発明においては、動物細胞での蛋白質発現に適した発現制御配列を用いることが望ましい。例えば、昆虫細胞発現ではポリヘドリンプロモーター、p10プロモーターなどが、その他の動物細胞発現ではSR α プロモーター、サイトメガロウ

イルス由来プロモーター、シミアンウイルス40由来プロモーター、ポリヘドリンプロモーター、p10プロモーターなどが発現制御配列として一般的に用いられているが、これらに限定されるものではない。本発明においてはSR α プロモーターを用いることが好ましい。

得られた組換えベクターを細胞に導入することにより、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体産生細胞を得る。このとき、動物由来細胞を宿主として用いることが好ましい。たとえば、COS細胞（サル腎臓細胞）、CHO細胞（チャイニーズハムスター卵巣細胞）、Sf9（昆虫細胞）などが宿主として一般的に利用されている。また、P3U1やY3などのミエローマ細胞を用いてもよい。その他の株化細胞やクローン化細胞も利用しうるが、これらに限定されるものではない。本発明においては、CHO細胞を用いることが好ましい。

細胞に組み換えベクターを導入する方法としては、リポフェクチン法やリン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法などが知られており、いずれの方法を用いてもよい。ただしこれらに限定されるものではない。組み換えベクターを用いて細胞を形質転換する際に、インテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質を発現する組み換えベクター、およびインテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖からなるキメラ蛋白質を発現する組み換えベクター、を薬剤耐性マーカーを変えて順次細胞に導入することが好ましい。導入はどのような順序で行ってもかまわない。また、同時に導入してもよい。導入する2種の組み換えベクターとしては、 α 鎖・免疫グロブリン重鎖（ α 鎖と免疫グロブリン重鎖のキメラ蛋白質の意、他も同様）と β 鎖・免疫グロブリン重鎖、 α 鎖・免疫グロブリン重鎖と β 鎖・免疫グロブリン軽鎖、 α 鎖・免疫グロブリン軽鎖と β 鎖・免疫グロブリン重鎖の組み合わせを発現するベクターがよい。これらのどの組み合わせでもよいが、好ましくは α 鎖・免疫グロブリン重鎖と β 鎖・免疫グロブリン重鎖を発現する組み換えベクターの組み合わせがよい。

いずれの形質転換方法、ベクターの組み合わせによっても、同時に2種の組み換えベクターで形質転換され、しかも α 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質および β 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質を同時にほぼ同量、産生している細胞を選別することが重要である。これは、組み換えベ

クターで形質転換された細胞の培養上清中の α 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質および β 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質の産生量を測定することで達成できる。測定方法としては、例えば公知の方法に従って形質転換細胞を ^{35}S を含む培地で培養することにより蛋白質をラベル化した後、培養上清中の α 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質および β 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質の存在量をそれぞれの抗 α 鎖抗体または抗 β 鎖抗体を用いる免疫沈降により推定することができる。他の方法としては、抗ヒト免疫グロブリン抗体と抗 α 鎖抗体または抗 β 鎖抗体を用いるELISA法によって培養上清中の α 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質および β 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質の存在量を推定することができる。いずれにしても培養上清中への α 鎖および β 鎖のキメラ蛋白質の産生量がほぼ同量で、多量に産生しているクローンを選別することがインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の調製のためには好ましい。蛋白質のラベル化方法、免疫沈降の方法、ELISAの一般的方法は成書に記載されているが("Antibody" Harlow, E. and Lane, D. (1988) Cold Spring Harbor Lab. Press, New York)、これに限定されるものではない。またキメラ蛋白質の検出のために他の方法も利用しうる。

得られた形質転換細胞を一般的な細胞培養の方法に従って培養し、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を産生させることができる。培地として、低免疫グロブリン濃度の血清を5%程度含む培地が好ましいが、一般に知られている血清含有培地や無血清培地でもよい。細胞を培養後、遠心分離などの操作により細胞および固形物を除去し、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を含む培養上清を回収する。

この培養上清中には α 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質と β 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質がヘテロダイマー複合体を形成したインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質だけでなく、ヘテロダイマー複合体を形成していない α 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質および β 鎖と免疫グロブリン重鎖または軽鎖のキメラ蛋白質が混入していると推定できる。しかし、ヘテロダイマー複合体以外の分子はリガンドへの結合能を持たないことから、この培養上清をリガンドまたは細胞との結合の試験、インテグリン

ンとリガンドの結合を阻害する物質の探索、インテグリンに結合する物質の探索、インテグリンのリガンド量を測定する試薬、として利用することができる。これらの利用方法は、後述する精製したインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を用いる場合と基本的には同じである。

インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の精製は、免疫グロブリン部分の性質を利用してプロテイン A カラム担体を用いる定法に従って達成できる。また、 α 鎖または β 鎖に対する抗体を用いる親和性クロマトグラフィーの手法を利用してもよい。さらに、リガンドを担体に結合した親和性クロマトグラフィーの手法により精製することもできる。一般的なクロマトグラフィーの方法を組み合わせることもできる。インテグリン分子をこれらの方法で精製した公知例 (Pytela, R. et al. *Methods Enzymol.* 144, 475-489 (1987)、Santoro, S. A. et al. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 153, 217-223 (1988)、Charo, I. F. et al. *J. Cell Biol.* 111, 2795-2800 (1990)、Makarem, R. et al. *J. Biol. Chem.* 269, 4005-4011 (1994)、Pfaff, M. et al. *Eur. J. Immunol.* 225, 975-984 (1994)、Gulino, D. et al. *Eur. J. Biochem.* 227, 108-115 (1995)など) を応用すれば、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の精製は達成できる。

精製したインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体は、SDS-PAGEにより非還元下で少なくとも1本のバンドを示し、還元下で少なくとも2本のバンドを示す蛋白質として同定できる。また、これによりヘテロダイマーが免疫グロブリン重鎖間のジスルフィド結合により連結されていることを確認できる。まれに、還元下で複数のバンドが検出できることがあるが、これは α 鎖の分子内切断が起こっているためと考えられる。特に $\alpha 4$ でこの現象が知られている (Hemler, M. E. et al. *J. Biol. Chem.* 262, 11478-11485 (1987))。さらに、それぞれのバンドがキメラ蛋白質であることは、ウェスタンブロッティングなどの方法により確認できる。別の方法として、得られた分子がインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体であることは、前述の抗 α 鎖抗体、抗 β 鎖抗体、抗ヒト免疫グロブリン抗体を組み合わせたELISAにより確認できる。つまりすべての抗体に対するエピトープを持つ蛋白質分子として同定できる。さらに別の方法として、免疫沈降によってインテグリン-免疫

グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を同定することもできる。この場合には、精製した蛋白質を公知の方法を用いて³⁵Sまたは¹²⁵Iまたはビオチンなどでラベル化した後、抗 α 鎖抗体、抗 β 鎖抗体、抗ヒト免疫グロブリン抗体を用いて免疫沈降するといずれの場合にも同じ電気泳動パターンが得られることで、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が目的とする構造をとっていることを確認することができる。さらに、細胞膜上のインテグリン複合体が解離する条件、例えばEDTAの共存や、SDSの存在下での煮沸などの操作を加えても免疫沈降パターンが変化しないことから、得られたインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質が構造的に安定化された複合体であることを確認できる。インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の確認方法はこれらによって限定されるものではない。

調製したインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とリガンドとの結合は以下のように試験することができる。リガンドとインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を接触させて混合物を作製した後に、リガンドに結合したインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の量またはインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体に結合したリガンド量を測定する。インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体量の測定は、複合体自身を蛍光色素または酵素またはラジオアイソトープなどで標識しておくことで行うことができる。リガンド量の測定も同様の手法で行うことができる。SPA（アマシャム社）のような検出方法を利用して測定することもできる。さらに、蛍光色素、酵素、ラジオアイソトープなどで標識した複合体またはリガンドを認識する試薬を利用して測定することもできる。インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を認識する試薬としては、例えば抗ヒト免疫グロブリン抗体がある。本試験においては、検出される分子を何らかの担体、例えばビーズやプレート、に結合させておくことが好ましい。また、リガンドは分子全体だけでなく、インテグリンとの結合活性を保持する一部分を取り出して使用することもできる。例えば、インテグリン $\alpha 4 \beta 1$ またはインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ については、そのリガンドであるフィブロネクチンまたはコラーゲンやそのペプチド断片を担体に結合させて使用することができる。

上記と同様の手法を用いて、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と細胞との結合を試験することができる。複合体に結合した細胞量の測定は、細胞を蛍光色素またはラジオアイソトープで標識するか、あるいは細胞と反応する試薬、例えば表面抗原と反応する抗体を利用することで行いうる。細胞の代わりに、組織切片のようなものを用いた場合は、結合するインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体量を前記のいずれかの方法により測定することになる。

これまでに述べたインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とリガンドまたは細胞との結合を調べる方法は、そのままインテグリンとリガンドとの結合を阻害する物質、例えば抗体、ポリペプチド、ペプチド、低分子化合物を取得することに利用できる。好ましくは、被検物とインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体をあらかじめ混合したのちに上記の測定系にてインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体のリガンドへの結合量を測定する。インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合量が、ある被検物質を加えて下がるようであれば、その被検物質に阻害活性があると判断できる。ただしこの系では、金属イオンキレート作用を持つ物質や界面活性作用を持つ物質などが擬陽性の結果をもたらす可能性がある。被検物質のソースとしては、下述のインテグリン結合物質、リガンドのペプチド断片、その誘導体、市販の化合物などを利用するが、この限りではない。

これまでに、精製したインテグリンをプレートに固相化し、結合するペプチドを探索した例が報告されている(Healy, J. M. et al. Biochemistry 34, 3948-3955 (1995))。本発明で得られるインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を用いても、同様にインテグリンに結合する物質を探索することができる。特に、本発明のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を用いた場合には、非特異的に結合した物質を除去するための操作をより厳しい条件で行うことから、操作の簡略化がはかられる利点がある。また、操作途中の複合体の解離がないことから、より特異的に結合物質を選択できる利点がある。結合物質を選択するソースに適したものとして、ファージペプチドライブラリー(例えば Scott, J. K. and Smith, G. P. Science 249, 386-390 (1990))やDNAオリゴ

マーのライブラリー（例えば O'Connel, D. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 5883-5887 (1996)）が知られているが、本発明においては前者を用いることが好ましい。

さらに前記のインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とリガンドあるいは細胞の結合を試験する方法は、体液や組織中でのインテグリンのリガンド量の変化を測定する方法として利用できる。

また、本発明のインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体は医薬として用いることができる。具体的には、本発明により、インテグリンをはじめとする単離した細胞外マトリックスレセプターが血小板代替物として利用できることが明らかになった。

血小板代替物として用いる細胞外マトリックスレセプターとしてはインテグリンが好ましい。インテグリンの α 鎖としては $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ 、 $\alpha 8$ 、 $\alpha 9$ 、 αv 、 αL 、 αM 、 αX 、 αIIb 、または αE があげられるが、中でも $\alpha 2$ が好ましい。 β 鎖としては $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 6$ 、 $\beta 7$ 、または $\beta 8$ があげられ、中でも $\beta 1$ が好ましい。より好ましくはインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ である。単離するためのレセプターソースとしては、細胞外マトリックスレセプターを発現する組織や細胞、遺伝子組み換え法により作製したレセプター発現細胞の膜分画の溶解物などが利用できる。より好ましくは、遺伝子組み換え法によりレセプター遺伝子に変異を加えて可溶化体となるように設計し、これを産生する細胞の培養上清をソースとして使用する。さらに、可溶化体を設計する上では、細胞外マトリックスレセプターの機能的な構造が維持されるようにすることが好ましい。例えば、インテグリンのヘテロダイマー構造を、 α 鎖と β 鎖を共有結合などにより会合できるように改変したインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を用いることが望ましい。インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体としては、 α 鎖が $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ 、 $\alpha 8$ 、 $\alpha 9$ 、 αv 、 αL 、 αM 、 αX 、 αIIb 、または αE であるものが好ましく、中でも $\alpha 2$ であるものが好ましい。また、 β 鎖としては $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 6$ 、 $\beta 7$ 、または $\beta 8$ であるものが好ましく、中でも $\beta 1$ であるものが好ましい。より好ましくは α 鎖が $\alpha 2$ であり、 β 鎖が $\beta 1$ である。

以下、本発明の血小板代替物を細胞外マトリックスレセプターの代表例であるインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を中心に説明するが、本発明はこれに限定されない。

精製したインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の医薬用途を確認するためには、精製した蛋白質そのものを用いて薬理活性を調べる。より好ましくは、細胞外マトリックスへのより高い結合能を得るために、インテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を脂質や蛋白質重合体などからなる担体に結合させて用いるが、これには限定されない。

血小板代替物として用いる場合には、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を、既報 (Martin, F.J. et al. Biochemistry, 20, 4229 (1981))の方法に準じて、リポソームに共有結合させて用いることが好ましい。担体としては、リポソーム以外のどのような薬物担体でも、医薬品用途が容認されるものであればよい。リポソーム担体を用いる場合、成書 (「リポソームの作製と実験法」、奥 直人 (1994)、廣川書店)にある組成、方法を用いてリポソームを作製するが、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の細胞外マトリックスへの結合エピトープがリポソーム膜の外側に露出する方法が好ましい。

ここで調製したリポソーム担体上に、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が結合していることを確認する方法として、フローサイトメーターを使用する。インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を認識する試薬としては、抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体、抗インテグリン $\beta 1$ 抗体、抗ヒト免疫グロブリン抗体などを利用することができる。利用する抗体が、蛍光標識されている場合はそのまま測定に供するが、蛍光標識されていない場合には、抗体を作製した動物種の免疫グロブリンクラスを認識する2次抗体の蛍光標識体を用いて行う。これ以外の確認方法として、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体自身を酵素またはラジオアイソトープなどで標識し、発色色素や放射活性測定装置などとの適切な組み合わせによって確認することも可能である。

インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームを用いて細胞外マトリックス結合能を調べるには、生理的な陽イオン濃

度を含む緩衝液中または血漿中にインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームを懸濁して用いることが好ましい。ここで言う生理的な陽イオン濃度を含む緩衝液とは、少なくとも、Mgイオン、Caイオンのような陽イオンを含み、中性付近に調整されたものを言う。また、血漿は、抗凝固剤の存在下で採血し、一般的な血漿作製法にて調製する。たとえば、抗凝固剤としてヘパリンやEDTA溶液を十分な単位数加えて用いることができる。市販されている正常血漿、凝固因子欠乏血漿や血清などを用いてもよい。ただし、使用する抗凝固剤により陽イオン濃度が低下する場合、後に生理的な濃度になるように陽イオンを添加して使用する。次に、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームを、担体に固相化した細胞外マトリックスあるいはその一部の断片と一定時間混合して結合の有無を判定する。細胞外マトリックスあるいはその一部の断片の固相化は、プラスチックプレートなどを用いて行うことが好ましいが、市販の細胞外マトリックス固相化ビーズなどを用いてもよい。細胞外マトリックスとして、コラーゲンを用いる場合、どのような動物種およびタイプを用いてもよい。インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームと細胞外マトリックスとの結合反応は、血小板の粘着反応をみるのに一般的な方法に準じて行う。多くの場合は、主に静止系で一定時間放置し、マトリックスへの結合を誘導するが、好ましくは、振とう負荷、ずり応力などを加える。

インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームは、上述のような条件下で細胞外マトリックスに結合するが、この結合量は、抗ヒト免疫グロブリン抗体を用いる上述のELISA法を応用して測定する。より正確な定量のためには、マトリックスに結合したリポソームを1%グルタルアルデヒドなどにより固定しておくことが望ましい。また、ELISA法以外に、たとえば放射標識した脂質をリポソームにあらかじめとりこませておけば、細胞外マトリックスに結合したリポソーム量を放射活性として求めることもできる。さらに、細胞外マトリックスへの結合および被覆度を定性的に判断するには、結合したリポソーム上のインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を認識する標識抗体と発色色素などを組合わせ、リポソームが結合している部分を染色することができる。より好ましくは、一般的に使用さ

れる組織抗体染色の方法を利用し、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンヘテロダイマー複合体に対するペルオキシダーゼ標識抗体とジアミノベンチジンを組合わせるが、この方法に限定されない。他の方法として、細胞外マトリックスを被覆した面積を、画像処理解析装置を用いて被覆率を求めてもよい。

血小板の止血機能検査として、血小板の細胞外マトリックスへの粘着能、コラーゲンにより誘導される凝集能をみる方法がある（「血液凝固検査ハンドブック」p65-78、福武勝博、藤巻道夫（1987）宇宙堂八木書店、Santoro, S. A. Cell, 46, 913-920（1986）、Lethagen, S. and Rugarrn, P. Thrombo Haemost, 67, 185-186（1982））。特に、血小板の細胞外マトリックスへの粘着能の高さが、一次止血能の高さの指標となる。この粘着能の評価は、血液をそのまま用いるか、もしくは多血小板血漿や生理イオン条件の緩衝液で洗浄した血小板を用いて行う。従って、本発明で得られたインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームが血小板の機能代替物となりうるかどうかは、血漿成分存在下、あるいは生理的なイオン濃度条件下における細胞外マトリックスへの結合性の有無、結合性の高さで判断できる。

本発明で得られるインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームの血漿成分存在下における細胞外マトリックスへの強い結合性は、血小板代替物となりうることを示している。従って血小板異常による先天性および後天性の出血傾向に対する治療・予防薬として、広くは、血小板輸血代替物として使用できる。

同様にして、本発明で得られるインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームは、血管内皮細胞障害が問題となる病態の治療・予防薬となりうる。例えば、PTCA（経皮的冠血管再狭窄）の予後においては、バルーンカテーテル処理により露出した細胞外マトリックスへの血小板の過剰集積が、再狭窄の引き金となることが報告されている（Liu, M. W. et al. Circulation, 79, 1374-1378（1989））。実施例22においてインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームの細胞外マトリックス被覆効果が確認されたが、この効果により血小板の過剰集積が軽減され、再狭窄予防薬としても利用しうる。また、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームを医薬用途で許容される

方法で標識すれば、血管内皮細胞障害により露出した細胞マトリックス露出部位のモニタリングに利用できるほか、リポソーム内への薬剤封入により、障害部位局部へのターゲティング療法へも応用できる。

本発明で示されるインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームを血小板代替物として用いる場合の投与経路としては、輸液注入もしくは静脈内投与などが挙げられ、通常、塩溶液または血漿などの生理学的に適合する溶液に懸濁して用いられる。また、単独で用いても、他の細胞外マトリックスレセプターやその免疫グロブリンとのキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と組み合わせて用いてもよい。また、全血小板を含む他の薬剤と一緒に用いることもできる。投与量は症状、年齢、体重等に応じて適宜選択されるが、成人に対して、蛋白質量として1日0.1mg~10gであり、1回または数回に分けて投与することができる。また、薬学的に許容される担体、賦形剤などと混合し、軟膏剤、塗布剤、貼付剤などの外用剤として障害部位へ局所的に投与することも可能である。この場合には1回塗布あたり蛋白質量として1ng/cm²~1mg/cm²となるように調製される。

実施例

以下、本発明をより詳しく説明するために実施例をあげる。一般的な組み換えDNA実験の手法は成書の方法("Antibody" Harlow, E. and Lane, D. (1988) Cold Spring Harbor Lab. Press, New York)に準じた。

実施例1

ヒトIgG₁重鎖発現ベクターの作製

ヒトIgG₁ゲノム遺伝子は、報告された塩基配列情報(Ellison, J. W. et al. Nucleic Acids Res. 10, 4071-4079 (1982))に基づくハイブリダイゼーションcDNAプローブを用い、ヒトゲノムライブラリー(CLONTECH)から上述の配列情報に一致するクローンを取得した。これをPCRの鋳型DNAとした。ヒトIgG₁遺伝子のヒンジ領域(H)と定常領域部分(CH2とCH3)を含むDNA断片を増幅するためのプライマーとしてBamH I制限サイトを挿入した配列表の配列番号4(以下、配列表の配列番号を、配列番号と略す)、Xba I制限サイトを挿入した配列番号5に示すDNAオリゴマーを合成した。

5' -GCGGATCCCGAGCTGCTGGAAGCAGGCTCAG-3'

(配列番号 4)

5' -CCTCTAGACGGCCGTCGCACTCATTTA-3'

(配列番号 5)

鋳型 DNA、プライマー、dNTPs (dATP、dCTP、dGTP、dTTP 等モル混合液)、Taq ポリメラーゼ (Takara) を PCR 緩衝液 (10 mM Tris-HCl、500 mM KCl、15 mM MgCl₂、0.01% gelatin pH8.3) 中で混合したのち、サーマルサイクラー (Perkin Elmer Cetus) にて、DNA 変性を 94 °C で 1 分、プライマーのアニーリングを 58 °C で 2 分、プライマーの伸長を 72 °C で 3 分を 30 サイクル行った。増幅した DNA を制限酵素 BamH I および Xba I で消化後、常法 ("Antibody" Harlow, E. and Lane, D. (1988) Cold Spring Harbor Lab. Press, New York) に従い、1 % アガロースゲルにて DNA 断片を精製した。これを制限酵素 BamH I および Xba I で消化して精製した pBlue script SK (+) (STRATAGENE) の大 DNA 断片と T4 DNA リガーゼを用いて連結した。このプラスミド DNA を用いて大腸菌 (JM109) を形質転換し、形質転換株を選択してプラスミド DNA (IgG, Blue script) を得た。次に、発現ベクター pcDL-SR α 296 を制限酵素 BamH I で消化後、T4 DNA ポリメラーゼ処理にて平滑端とし、Not I リンカーを連結した。これを、制限酵素 Not I および Xho I 消化した大 DNA 断片と IgG, Blue script を制限酵素 Not I および Xho I 消化した小 DNA 断片を常法に従って精製し、両 DNA 断片を T4 DNA リガーゼで連結した。これを大腸菌 (HB101) に形質転換した後に形質転換株を選択してプラスミド DNA を得た。以下、該プラスミド (IgG, SR α) をヒト IgG 発現ベクターと呼ぶ。なお、以後の実施例で述べる遺伝子組み換えの基本的な操作は上記と同様であるので簡略に述べる。

実施例 2

インテグリン $\alpha 4$ ・IgG 重鎖キメラ蛋白質発現ベクターの構築

インテグリン $\alpha 4$ の細胞外部分を暗号化する DNA 断片は、既報の cDNA 配列情報 (Takada, Y. et al. EMBO J. 8, 1361-1368 (1989)) をもとにクローニングした。配列番号 1 の 1801 塩基位の制限サイト EcoR I、112 塩基位の制限サイト Stu I、2949 塩基位の制限サイト BamH I を連結に利用し、N 端翻訳開始点から Stu I 切断部位を $\alpha 4-1$ 、Stu I から EcoR I 切断部位を $\alpha 4-2$ 、

EcoR IからBamH I切断部位を $\alpha 4-3$ とし、これを連結することによって得た。
以下に具体的な方法を示す。

$\alpha 4-1$ を暗号化する部分は配列番号6～9のDNAオリゴマーを連結してクローニングする設計とし、配列番号6～9に示すDNAオリゴマーを合成した。配列番号6、7には、ベクターへの連結のためにN端を暗号化する側に制限サイトXba Iを付加した。また、既知配列情報と比較して配列番号1の60、63、64位の塩基をC→T、C→A、C→Gに置換、112、114位の塩基をC→A、C→Gに置換した。112、114位の置換により、配列番号：8、9のN端を暗号化する側に制限サイトStu Iを挿入した。合成したオリゴマーの5'末端をリン酸化、アニーリングした後、T4 DNAリガーゼを用いて連結した。連結後、制限酵素Xba IとStu Iで切断し、5%アガロース(NuSieve GTG agarose、FMC)ゲルにて電気泳動し、目的とする約120bpのDNA断片($\alpha 4-1$)を切り出して、精製した。

5' -CTAGACCACCATGTTCCCCACCGAGAGCGCATGGCTTGGGAAGCGAGGCGCGAACCCGGGCCCCCGGA
GCTGCA-3' (配列番号6)

5' -GCTTCGGGGCCCCGGGTTCCGCGCCTCGCTTCCCAAGCCATGCGCTCTCGGTGGGGAACATGGTGGT-3'
(配列番号7)

5' -CTCCGGGAGACGGTGATGCTGTTGCTGTGCCTGGGGGTCCCGACCGGCAGG-3'
(配列番号8)

5' -CCTGCCGGTCGGGACCCCCAGGCACAGCAACAGCATCACCGTCTCCCGGAGTCGA-3'
(配列番号9)

次に、インテグリン $\alpha 4$ 発現細胞であるヒト骨肉腫細胞株MG63(ATCC CRL 1427)のRNAを分離し、オリゴdTセルロースカラム(NEB)を用いてPoly A(+) RNAを精製した。これをもとに逆転写酵素(GIBCO)を用いて1本鎖cDNAを合成し、PCRの鋳型として使用した。 $\alpha 4-2$ 、 $\alpha 4-3$ のDNAを増幅するプライマーとして、Pst I、Stu I制限サイト(配列番号10)、BamH I制限サイト(配列番号13)を挿入した配列番号10～13の4本のDNAオリゴマーを合成した。

5' -CACTGCAGGCAGGCCTTACAACGTGGACACTGAGAGC-3' (配列番号10)

5' -GCAGAAACCTGTAAATCAGCAG-3' (配列番号11)

5' -GCATTTATGCGGAAAGATGTGC-3'

(配列番号 1 2)

5' -CGGGATCCGTGAAATAACGTTTGGGTCTT-3'

(配列番号 1 3)

鋳型 c D N A とプライマー、d N T P s、T a q ポリメラーゼを P C R 緩衝液中で混合したのち、サーマルサイクラーにて、D N A 変性を 9 4 ° C で 1 分、プライマーのアニーリングを 5 8 ° C で 2 分、プライマーの伸長を 7 2 ° C で 3 分を 3 0 サイクル行った。増幅した $\alpha 4 - 2$ 、 $\alpha 4 - 3$ の D N A 断片をそれぞれ Pst I および EcoR I、EcoR I および BamH I で消化後、p B l u e s c r i p t K S (+) (S T R A T A G E N E) にサブクローニングし、プラスミド D N A (以下、 $\alpha 4 - 2$ B l u e s c r i p t、 $\alpha 4 - 3$ B l u e s c r i p t) を調製した。次に、 $\alpha 4 - 2$ B l u e s c r i p t の上流に、Xba I および Stu I 制限サイトを利用して $\alpha 4 - 1$ を連結し、プラスミド D N A (以下、 $\alpha 4 - 1 - 2$ B l u e s c r i p t) を調製した。

$\alpha 4 - 1 - 2$ B l u e s c r i p t を、制限酵素 Not I で消化後 T 4 D N A ポリメラーゼ処理にて平滑末端としたのち、制限酵素 EcoR I で消化し、小 D N A 断片を調製した。 $\alpha 4 - 3$ B l u e s c r i p t は、制限酵素 EcoR I および BamH I で消化して、小 D N A 断片を精製した。次に、この 2 つの小 D N A 断片を、I g G γ S R α を制限酵素 EcoR V および BamH I で消化して得られる大 D N A 断片に同時に連結し、プラスミド D N A を得た。得られたインテグリン $\alpha 4 \cdot$ I g G 重鎖キメラ蛋白質を暗号化する塩基配列を、配列番号 1 に示す。以下、該プラスミド (インテグリン $\alpha 4 \cdot$ I g G S R α) を、インテグリン $\alpha 4 \cdot$ I g G 重鎖キメラ蛋白質発現ベクターと呼ぶ。

実施例 3

インテグリン $\beta 1 \cdot$ I g G 重鎖キメラ蛋白質発現ベクターの構築

インテグリン $\beta 1$ 発現細胞として、ヒト繊維芽細胞株 M R C 5 (A T C C C C L 1 7 1) の R N A を分離し、オリゴ d T セルロースカラムを用いて P o l y A (+) R N A を精製した。これをもとに逆転写酵素を用いて 1 本鎖 c D N A を合成し、P C R の鋳型として使用した。プライマーとして、配列情報 (Scott Argraves, W. et al. J. Cell Biol. 105, 1183-1190 (1987)) に従い、C 端を暗号化する側に BamH I 制限サイト (配列番号 1 5) を挿入して配列番号: 1 4 および 1 5 の 2 本の D N A オリゴマーを合成した。

5' -GCGGAAAAGATGAATTTACAAC-3'

(配列番号 14)

5' -GTGGGATCCTCTGGACCACTGGGACAC-3'

(配列番号 15)

鋳型 cDNA、プライマー、dNTPs、Taq ポリメラーゼを PCR 緩衝液中で混合したのち、サーマルサイクラーにて、DNA 変性を 94 °C で 1 分、プライマーのアニーリングを 57 °C で 2 分、プライマーの伸長を 72 °C で 3 分を 30 サイクル行った。増幅した DNA を、T4 DNA ポリメラーゼ処理により末端を平滑化したのち、制限酵素 BamH I で消化後 DNA 断片を精製した。次に、p Bluescript KS (+) の Sma I および BamH I サイトに、先の PCR で得た DNA 断片をサブクローニングした。さらにこれを、制限酵素 EcoR I および BamH I で消化して精製した小 DNA 断片を、制限酵素 EcoR I および BamH I 処理した IgGSR α の大 DNA 断片に挿入し、プラスミド DNA を得た。得られたインテグリン β 1 · IgG 重鎖キメラ蛋白質を暗号化する塩基配列を、配列番号 2 に示す。以下該プラスミド (インテグリン β 1 · IgGSR α) をインテグリン β 1 · IgG 重鎖キメラ蛋白質発現ベクターと呼ぶ。

実施例 4

インテグリン α 4 · IgG 重鎖キメラ蛋白質発現ベクターおよびインテグリン β 1 · IgG 重鎖キメラ蛋白質発現ベクターの動物細胞への導入と発現

インテグリン β 1 · IgG 重鎖キメラ発現ベクターであるインテグリン β 1 · IgGSR α と pSV2dhfr (BRL) を 10 : 1 の割合で混合し、これとリポフェクチン試薬 (GIBCO BRL) を緩やかに混合して室温 15 分間静置後、ジヒドロ葉酸リダクターゼ欠損 CHO 細胞 (ATCC CRL 9096) に滴下した。滴下 18 時間後に培養培地 (10% FBS (GIBCO)、核酸含有 α MEM 培地 (GIBCO BRL)) に交換して約 2 日間培養したのち、トリプシン-EDTA 処理にて細胞を分散し、第一選択培地 (10% FBS 含有核酸不含 α MEM 培地 (GIBCO BRL)) に懸濁して、96 ウェルプレート (CORNING) 中に播種して約 10 日間選択培養した。その後、培養上清中に産生されるインテグリン β 1 · IgG 重鎖キメラ蛋白質量を ELISA 法 (後述) により測定し、最も高い産生量を示すクローンを、限界希釈法によるクローニングにより安定化した。

次に、安定化したインテグリン β 1 · IgG 重鎖キメラ蛋白質産生 CHO 細胞

に、上記と同様のリポフェクチン法によりインテグリン $\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ発現ベクターを形質移入した。すなわち、インテグリン $\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G S R } \alpha$ と pSV2neo (BRL) を10:1で混合し、これをリポフェクチン試薬と混合したのち、細胞に滴下した。滴下18時間後に先の第一選択培地に交換して約2日間培養した後、トリプシン-EDTA処理にて細胞を分散し、第二選択培地(10% FBS (GIBCO)、 1 mg/ml neomycin (GIBCO)) を含有する核酸不含 $\alpha \text{ MEM}$ 培地(GIBCO BRL)) に懸濁し、96ウェルプレート(CORNING)にて耐性細胞を約10日間選択培養した。培養上清中に産生されるインテグリン $\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質量とインテグリン $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質量をELISA法(後述)により測定し、両キメラ蛋白質の産生量がほぼ同等のクローンをピックアップした。このクローンを、限界希釈法により2回クローニングし、 $\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を産生するクローンとして安定化した。

実施例 5

ELISA法によるインテグリン $\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質およびインテグリン $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質産生量の測定

抗ヒトインテグリン $\alpha 4$ 抗体(Becton & Dickinson、クローンL25.3)、または抗ヒトインテグリン $\beta 1$ 抗体(Coulter、クローン4B4) $2 \mu \text{g/ml}$ を96ウェルイムノプレート(NUNC)に $50 \mu \text{l}$ /ウェルずついれ、 4°C 、16時間静置した。その後、各ウェルをダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(日水製薬、Caイオン、Mgイオン不含、以下PBS(-))にて2回洗浄し、25%ブロッケース(雪印乳業)含有PBS(-)にて非特異反応をブロックした。ブロッキング後、選択培養により増殖したCHO細胞の培養上清を適宜希釈して室温で抗体と1時間反応させた。反応後、0.02% Tween含有PBS(-) (以下T-PBS)で2回洗浄した。次にビオチン化抗ヒトIgG抗体(Vector)と1時間反応後、T-PBSで2回洗浄し、続いてアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ(Sigma)と1時間反応後、PBS(-)で2回洗浄した。PBS(-)を完全に吸引したのち、オルトフェニレンジアミンを基質として発色させ、マイクロプレートリーダー(Bio-rad NOVA PATH)を用いて490nmの吸光度を測定し、高い吸光度を

示すクローンを選択した。

実施例 6

$\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の精製
(1) CHO細胞の培養と培養上清の調製

$\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を高産生するCHO細胞を、5% FBS (Ultra-low Ig Gグレード、GIBCO) を含む核酸不含 α MEM培地 (以下 α MEM (-) 培地、GIBCO BRL) で1日培養し、セミコンフルエントとなった細胞を1% FBS (Ultra-low Ig Gグレード) を含む α MEM (-) 培地に交換して3日間培養したのち、培養上清を回収した。これをPrep-scale (Millipore) を用いた限外濾過により1/10容量まで濃縮し、最終濃度5 mMとなるように1 M HEPES溶液 (pH 8.0) を加えて精製原液とした。

(2) プロテインAカラムクロマトグラフィー

精製原液を、Prosep Guard担体 (bioPROCESSING) カラムに通過させたのち、Prosep A担体 (bioPROCESSING) カラムにアプライした。アプライ終了後、カラム体積の10倍容量のPBS (-) で洗浄し、続いて0.1 Mクエン酸緩衝液 pH 6~3 のグラジエントで蛋白質を溶出した。pH 3 で溶出されるピーク画分を回収、1 M Tris-HCl 溶液 (pH 8.5) を0.1容量加えて中和後、PBS (-) に対して透析した。

(3) アフィニティーカラムクロマトグラフィー

FMP活性化セルロファイン (生化学工業) をカップリング緩衝液 (50 mM Na_2CO_3 -NaHCO₃ pH 8.5) で平衡化したのち、ペプチド合成機で合成した配列番号3に示すペプチド (以下CS-1ペプチド) を加え、4℃、16時間転倒混和した。
Cys Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr (配列番号3)
混和後、カップリング緩衝液で洗浄し、ブロッキング緩衝液 (0.1 mM monoethanolamine、50 mM Tris-HCl pH 8.0) を加えてさらに室温で6時間転倒混和した。その後、TBS溶液 (150 mM NaCl、20 mM Tris-HCl、1 mM MnCl₂、pH 7.5) で十分に洗浄してCS-1ペプチド結合セルロファインカラムを作製した。このカラムに、精製原液をアプライして室温で3時間静置したのち、カラム体積の10倍容量の洗浄緩衝液 (1 M NaCl、0.1% Triton、20 mM Tris-HCl、1 mM MnCl₂ p

H 7.5) と同容量の T B S 溶液で洗浄した。洗浄後、溶出緩衝液 (10 mM EDTA、150 mM NaCl、20 mM Tris-HCl pH 7.5) を用いて C S - 1 カラムに結合した蛋白質を溶出した。溶出液を回収後、P B S (-) に対して透析した。

(4) S D S - P A G E

(3) の溶出画分を 6 . 0 または 7 . 0 % アクリルアミドゲルを用い、非還元下または還元下で S D S - P A G E を行ったのち、ゲルをクマシー染色した。その結果、非還元下では、 $\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とその多量体と考えられる 2 本のバンドが認められた。また、還元下では、インテグリン $\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質とインテグリン $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質と考えられる 2 本のバンド (1 7 0 k D a 、 1 3 5 k D a) およびインテグリン $\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質の分子内切断 (Hemler, M. E. et al. J. Biol. Chem. 262, 11478-11485 (1987)) に由来すると考えられる 2 本のバンド (8 0 k D a 、 9 0 k D a) が認められた。これらの結果は、(3) の溶出蛋白質が、 $\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と考えられる分子構造を有しており、しかもヘテロダイマーを構成する分子どうしが 1 g G 重鎖間のジスルフィド結合により連結されていることを示唆している。

実施例 7

$\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の同定と構造的安定性の検討

(1) 抗インテグリン抗体を用いる免疫沈降と陽イオンキレート剤の影響

基本的な方法は成書 ("Antibodies" Harlow E. et al. (1988) Cold Spring Harbor Lab. Press, New York) に従った。すなわち、 $\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と考えられる実施例 6 (3) の溶出蛋白質を lactoperoxidase 法を用いて ^{125}I ラベル化した。次に、A f f i g e l - 1 0 (B i o - r a d) を 0 . 1 M H e p e s 溶液 (p H 8 . 0) にて洗浄したのち、正常マウス 1 g G、抗ヒトインテグリン $\alpha 4$ 抗体 (クローン 1 1 C 2 B) および抗ヒトインテグリン $\beta 1$ 抗体 (クローン 4 B 4) を加えて 4 ° C で 1 6 時間反応させて共有結合させ、正常マウス 1 g G ビーズ、および各抗体ビーズを作製した。次に、 ^{125}I 標識 $\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質

質ヘテロダイマー複合体を、正常マウス Ig G ビーズと 4℃、4 時間転倒混和してプレクリアーしたのち、抗体ビーズと 4℃、16 時間転倒混和した。混和後、ビーズを洗浄緩衝液 (200 mM Tris-HCl、0.5 M NaCl、0.1 % NP-40、1 mM MgCl₂ または 10 mM EDTA pH 8.0) にて 3 回洗浄した。洗浄後、ビーズに電気泳動用サンプルバッファーを加えて 100℃で 5 分間処理し、遠心分離した後の上清を還元下で電気泳動した。泳動後、ゲルドライヤーにてゲルを乾燥させ、蛋白質をオートラジオグラフィーにて検出した。

1 mM MgCl₂ 存在下における免疫沈降の結果、抗ヒトインテグリン $\alpha 4$ 抗体と抗ヒトインテグリン $\beta 1$ 抗体の両ビーズから、 $\alpha 4 \cdot \text{Ig G 重鎖} - \beta 1 \cdot \text{Ig G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体}$ 構造から期待される同一の沈降パターンが得られた。これにより、実施例 6 の (3) で得られた蛋白質が $\alpha 4 \cdot \text{Ig G 重鎖} - \beta 1 \cdot \text{Ig G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体}$ であることを同定した。

一方、10 mM EDTA 存在下での抗インテグリン $\beta 1$ 抗体ビーズを用いた免疫沈降のパターンは、1 mM MgCl₂ 存在下と同様であり、インテグリン $\alpha 4 \cdot \text{Ig G 重鎖キメラ蛋白質}$ とインテグリン $\beta 1 \cdot \text{Ig G 重鎖キメラ蛋白質}$ との会合が、陽イオン依存性ではないことを明らかにした。以上の結果は、実施例 6 (3) で得た溶出蛋白が確かに $\alpha 4 \cdot \text{Ig G 重鎖} - \beta 1 \cdot \text{Ig G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体}$ であることを示すとともに、実施例 6 (4) の結果とあわせて、両蛋白質の会合が Ig G 重鎖間のジスルフィド結合を介した安定な会合であることを強く示唆している。

(2) $\alpha 4 \cdot \text{Ig G 重鎖} - \beta 1 \cdot \text{Ig G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体}$ のシーケンシャル免疫沈降による構造的安定性の検討

(1) に従って ¹²⁵I 標識 $\alpha 4 \cdot \text{Ig G 重鎖} - \beta 1 \cdot \text{Ig G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体}$ と、正常マウス Ig G ビーズ、抗ヒトインテグリン $\alpha 4$ 抗体 (11C2B) ビーズ、抗ヒトインテグリン $\beta 1$ 抗体 (4B4) ビーズを、4℃、4 時間反応させた後に洗浄した。洗浄後、2 % SDS 存在下で 100℃、5 分間煮沸し、遠心分離した後の上清 (第 1 次免疫沈降サンプル) を 1 % BSA 含有 PBS で 10 倍希釈し、再度抗インテグリン $\beta 1$ 抗体、抗インテグリン $\alpha 4$ 抗体ビーズと 4℃、16 時間反応させた。反応後ビーズを洗浄し、電気泳動用サンプル

バッファーを加え、100℃、5分間処理し、遠心分離した後の上清（第2次免疫沈降サンプル）を、SDS-PAGE／オートラジオグラフィーを行った。

その結果、第1次免疫沈降により得られた電気泳動パターンは、第2次免疫沈降においても同様に認められた。この結果は、 $\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体における $\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質と $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質の会合が、2% SDS存在下での煮沸においても解離しないことを示しており、ジスルフィド結合による安定なヘテロダイマー構造であることを強く支持するものである。

実施例 8

$\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体のVCAM-1への結合

CHO細胞から産生される $\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が、インテグリン $\alpha 4 \beta 1$ のリガンドに対し、結合能を有することをVCAM-1を発現する細胞への結合能で調べた。ヒトの正常さい帯静脈血管内皮細胞を $1 \text{ L} - 1.3 \text{ U} / \text{m l}$ で16時間培養してVCAM-1発現細胞を調製した。この細胞を、 1 m M E D T A で37℃、15分間処理して単一細胞に分散した。この細胞をサンプルチューブあたり 2×10^5 個に対し、 $\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を産生するCHO細胞の培養上清と、最終濃度 1 m M M n C l_2 または 3 m M E D T A 存在下で30分間反応させた。反応後、結合測定用緩衝液（24 mM Tris-HCl、10 mM Hepes、150 mM NaCl、1 mM M n C l_2 または1 mM EDTA、1% BSA、2 mM Glucose pH 7.4）を用いて1200 rpmで室温、5分間の遠心分離により2回洗浄した。洗浄後、FITC標識抗ヒト 1 g G 抗体（Cappel）を加え、室温で20分間反応後、同緩衝液で細胞を洗浄し、フローサイトメーター（ELITE、Coulter）にて測定した。

結果を図1に示す。 $\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を含む培養上清とVCAM-1発現細胞を反応させることにより、 $\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合を示す蛍光強度の増加が認められた。この結合は抗ヒトインテグリン抗体（抗 $\alpha 4$ 抗体：クローンL25.3、 $10 \mu \text{g} / \text{m l}$ + 抗 $\beta 1$ 抗体：クローン4B4、

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、および3 mM EDTAの添加により阻害された。この結果は、 $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が、細胞膜表面に存在するインテグリン $\alpha 4 \beta 1$ と同様にVCAM-1に対する結合能をもつことを示している。また、この結合が $\alpha 4 \beta 1$ 特異的であること、陽イオン依存性という結合の特徴を維持していることを示す。

実施例 9

フィブロネクチン上のペプチド断片に対する $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合

次に、インテグリン $\alpha 4 \beta 1$ のもうひとつのリガンドであるフィブロネクチン上のペプチド断片（配列番号3）に対する $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合能についても検討した。

まず、前記の報告（Humphries, M.J. et al. J. Biol. Chem. 262, 6886-6892 (1987)）に従って、配列番号3のペプチド断片（CS-1ペプチド）をラビット IgG （Sigma）に結合させて、CS-1-IgGを作製した。このCS-1-IgGをPBS（-）で希釈したのち、96ウェルイムノプレート（NUNC）に100 μl /ウェルずつ入れ、4℃、16時間静置することによりプレートに固相化した。

静置後、PBS（-）にて2回洗浄し、80℃、10分間加熱処理により熱変性処理した1%BSA-PBS溶液を300 μl /ウェルずつ入れて4℃、3時間処理することにより非特異反応をブロッキングした。次に、固相化したCS-1-IgGと $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を含むCHO培養上清（100 μl ）を30℃、3時間反応させた。非結合 $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を、0.1%BSA含有TBS緩衝液（150 mM NaCl、25 mM Tris-HCl、1 mM MnCl_2 pH 7.4）で2回洗浄除去し、結合した $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を、1次抗体としてビオチン標識抗ヒト IgG 抗体（Vector）、2次抗体としてアビジン標識西洋ワサビペルオキシダーゼ（Sigma）と結合させた後、TBS緩衝液で洗浄した。これに、基質としてオルトフェニレンジアミンを加え、発色後490 nmで吸光度を測定した。

その結果を図2に示す。 $\alpha 4 \cdot \text{IgG}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot \text{IgG}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘ

テロダイマー複合体と反応させることにより、CS-1ペプチドへの結合を示す吸光度の上昇がみられたが、この結合は、抗インテグリン $\alpha 4$ 抗体（クローンL25.3）、抗インテグリン $\beta 1$ 抗体（クローン4B4）、5 mM EDTAの存在下ではほぼ完全に阻害された。従って、 $\alpha 4 \cdot 1$ g G重鎖- $\beta 1 \cdot 1$ g G重鎖キメラ蛋白質へテロダイマー複合体が、フィブロネクチン上のペプチド断片であるCS-1ペプチドに対しても結合能を有すること、陽イオン依存性という結合の特徴が維持されていることが明らかとなった。

実施例 10

フィブロネクチン上のペプチド断片に対する $\alpha 4 \cdot 1$ g G重鎖- $\beta 1 \cdot 1$ g G重鎖キメラ蛋白質へテロダイマー複合体の結合測定系を利用した阻害ペプチドの評価

実施例9の結合測定系において配列番号16（以下GPEILDVPST）、17（以下GPEILEVPST）、18（以下GRGDSP）の3種のペプチドの効果を検討した。

Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr (配列番号16)

Gly Pro Glu Ile Leu Glu Val Pro Ser Thr (配列番号17)

Gly Arg Gly Asp Ser Pro (配列番号18)

各々のペプチドはペプチド合成機で合成した。各ペプチドと $\alpha 4 \cdot 1$ g G重鎖- $\beta 1 \cdot 1$ g G重鎖キメラ蛋白質へテロダイマー複合体を含むCHO培養上清100 μ lを室温で20分間混合した後、実施例9の方法に従ってCS-1- $\beta 1$ g Gへの結合を測定した。その結果を図3に示す。GPEILDVPSTは、0.1~10 μ g / mlにおいて濃度依存的な阻害活性を示したが、GPEILEVPST、GRGDSPによる結合阻害は認められなかった。この結果は、実施例9の結合測定系が、インテグリン $\alpha 4 \beta 1$ とCS-1ペプチドとの結合を阻害するペプチド（GPEILDVPST）の効果を特異的に検出できる系であることを示している。

実施例 11

インテグリン $\alpha 2 \cdot 1$ g G重鎖キメラ蛋白質発現ベクターの構築

インテグリン $\alpha 2$ の細胞外部分を暗号化するDNA断片は、既報のcDNA配列情報（Takada, Y. et al. J. Cell. Biol. 109, 397-407 (1989)）をもとに、 $\alpha 2-1$ と $\alpha 2-2$ に分割してサブクローニングし、発現ベクター上で1本化した。まず、インテグリン $\alpha 2$ 発現細胞であるヒト線維芽細胞株MRC-5（AT

CC CCL 171) のRNAを分離し、オリゴdTセルロースカラムを用いてPolyA(+) RNAを精製した。これをもとに1本鎖cDNAを合成し、PCRの鋳型として使用した。PCRプライマーとして、 $\alpha 2-1$ は配列番号20と21、 $\alpha 2-2$ は配列番号22と23のDNAオリゴマーを合成して使用した。

5' -GCTCGAGCAAACCCAGCGCAACTACGG-3' (配列番号20)

5' -ATAGTGCCCTGATGACCATTG-3' (配列番号21)

5' -GATGGCTTTAATGATGTGATTG-3' (配列番号22)

5' -TGTTGGTACTTCGGCTTTCTC-3' (配列番号23)

鋳型cDNAとプライマー、dNTPs、TaqポリメラーゼをPCR緩衝液中で混合後、サーマルサイクラーにて、PCR(反応条件: 94℃1分-60℃2分-72℃3分)を30サイクル行った。増幅した $\alpha 2-1$ のDNA断片は、制限酵素Xho I およびEcoR Iで消化して精製し、 $\alpha 2-2$ のDNA断片はT4 DNAポリメラーゼ処理により末端を平滑化したのち、制限酵素EcoR Iで消化して精製した。精製した2つのDNA断片をリン酸化反応液(50 mM Tris-HCl、10 mM MgCl₂、25 mM DTT、1 mM ATP、0.1 U/ μ l T4 ポリヌクレオチドギナーゼ(Takara) pH 8.0)中で37℃、1時間反応後、68℃、5分間熱処理して酵素を失活させた。次に、実施例1で作製したIgGSR α を制限酵素Bam H Iで消化後、Klenow反応液(66 mM Tris-HCl、10 mM MgCl₂、10 mM DTT、0.2 mM dNTPs、0.05 U/ μ l Klenow fragment (Takara) pH 7.5)中で37℃、30分間反応させて末端を平滑化し、70℃、5分間熱処理して酵素を失活させた。さらに制限酵素Xho Iで消化し、大DNA断片を精製した。この大DNA断片に、先にリン酸化した2つ($\alpha 2-1$ 、 $\alpha 2-2$)のDNA断片を挿入し、プラスミドDNAを得た。得られたインテグリン $\alpha 2$ ・IgG重鎖キメラ蛋白質を暗号化する塩基配列を、配列番号19に示す。以下該プラスミド(インテグリン $\alpha 2$ ・IgGSR α)をインテグリン $\alpha 2$ ・IgG重鎖キメラ蛋白質発現ベクターと呼ぶ。

実施例12

インテグリン $\alpha 2$ ・IgG重鎖キメラ蛋白質発現ベクターおよびインテグリン $\beta 1$ ・IgG重鎖キメラ蛋白質発現ベクターの動物細胞への導入と発現

実施例 4 で作製し、安定化したインテグリン $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質産生 CHO 細胞に、実施例 4 と同様のリポフェクチン法によりインテグリン $\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ発現ベクターを形質移入した。すなわち、インテグリン $\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G S R } \alpha$ と p S V 2 n e o (B R L) を 10 : 1 で混合し、これをリポフェクチン試薬と混合したのち、細胞に滴下した。滴下 18 時間後に第一選択培地に交換して約 2 日間培養した後、トリプシン - E D T A 処理にて細胞を分散し、第二選択培地に懸濁し、96 ウェルプレートに播種して耐性細胞を約 10 日間選択培養した。その後、培養上清中に産生されるインテグリン $\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質量とインテグリン $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質量を E L I S A 法（後述）により測定し、両キメラ蛋白質の産生量がほぼ同等のクローンをピックアップした。このクローンを、限界希釈法により 2 回クローニングし、 $\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を産生するクローンとして安定化した。

実施例 13

E L I S A 法によるインテグリン $\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質およびインテグリン $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質産生量の測定

抗ヒトインテグリン $\alpha 2$ 抗体 (B e c t o n & D i c k i n s o n、クローン P 1 E 6)、または抗ヒトインテグリン $\beta 1$ 抗体 (クローン 4 B 4) $2 \mu \text{g} / \text{m l}$ を 96 ウェルイムノプレートに $50 \mu \text{l} / \text{ウェル}$ ずつ入れ、 4°C 、16 時間静置した。その後、各ウェルを P B S (-) にて 2 回洗浄し、ブロッキング後、選択培養により増殖した CHO 細胞の培養上清を適宜希釈して室温で抗体と 1 時間反応させた。反応後、T - P B S で 2 回洗浄し、ビオチン化抗ヒト 1 g G 抗体と 1 時間、アビジン - 西洋ワサビペルオキシダーゼと 1 時間反応後、P B S (-) で 2 回洗浄した。洗浄後、オルトフェニレンジアミンを基質として発色させ、マイクロプレートリーダーを用いて 490 nm の吸光度を測定し、高い吸光度を示すクローンを選択した。

実施例 14

$\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の精製
(1) CHO 細胞の培養と培養上清の調製

$\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を高

産生するCHO細胞を、5% FBS (Ultra-low IgGグレード)を含む α MEM(-)培地で1日培養し、セミコンフルエントとなった細胞を1% FBS (Ultra-low IgGグレード)を含む α MEM(-)培地に交換して3日間培養したのち、培養上清を回収した。これを限外濾過により1/10容量まで濃縮し、最終濃度5 mMとなるように1 M HEPES溶液(pH 8.0)を加えて精製原液とした。

(2) プロテインAカラムクロマトグラフィー

精製原液を、Prosep Guard担体カラムを通過させたのち、Prosep A担体カラムにアプライした。アプライ終了後、カラム体積の10倍容量のPBS(-)で洗浄し、続いて0.1 M クエン酸緩衝液 pH 6~3 のグラジエントで蛋白質を溶出した。pH 3で溶出されるピーク画分を回収、1 M Tris-HCl溶液(pH 8.5)を0.1容量加えて中和後、PBS(-)に対して透析した。

(3) アフィニティーカラムクロマトグラフィー

報告(Kirchhofer, D. et al. J. Biol. Chem. 265, 615-618 (1990))に従ってコラーゲン(Type I, Sigma)をcyanogen-bromide-activated sepharose (Sigma)にカップリングさせたコラーゲン固定化カラムを作製した。次に、精製原液をTBS緩衝液(150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl、1 mM MgCl₂、1 mM MnCl₂ pH 7.5)に平衡化したのち、カラムにアプライして室温で3時間静置したのち、カラム体積の10倍容量の洗浄緩衝液(150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl、1 mM MgCl₂、1 mM MnCl₂、100 mM Octyl glucopyranoside pH 7.5)で洗浄した。洗浄後、溶出緩衝液(20 mM EDTA、150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl、50 mM Octyl glucopyranoside pH 7.5)を用いてカラムに結合した蛋白質を溶出した。溶出液を回収後、PBS(-)に対して透析した。

(4) SDS-PAGE

(3)の溶出画分を7.0%アクリルアミドゲルを用い、非還元下または還元下でSDS-PAGEを行ったのち、ゲルをクマシー染色した。その結果、非還元下では、 $\alpha 2 \cdot 1$ g G重鎖- $\beta 1 \cdot 1$ g G重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と考えられるバンドが認められた。また、還元下では、インテグリン $\alpha 2 \cdot 1$ g G重鎖キメラ蛋白質とインテグリン $\beta 1 \cdot 1$ g G重鎖キメラ蛋白質と考えら

れる2本のバンド(185 kDa、135 kDa)が認められた。これらの結果は、溶出蛋白質が、 $\alpha 2 \cdot 1$ g G重鎖- $\beta 1 \cdot 1$ g G重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と考えられる分子構造であり、しかも1 g G重鎖間のジスルフィド結合により連結されていることを示唆している。

実施例 15

$\alpha 2 \cdot 1$ g G重鎖- $\beta 1 \cdot 1$ g G重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の同定と構造的安定性の検討

実施例 14 (3) の溶出蛋白質を 125 I ラベル化し、実施例 7 と同様に正常マウス1 g G、抗ヒトインテグリン $\alpha 2$ 抗体(クローンP1E6)および抗ヒトインテグリン $\beta 1$ 抗体(クローン4B4)ビーズを用いて免疫沈降を行い、還元下でのSDS-PAGE/オートラジオグラフィーした。

その結果、1 mM MgCl₂または10 mM EDTAのいずれにおいても、抗ヒトインテグリン $\alpha 2$ 抗体と抗ヒトインテグリン $\beta 1$ 抗体の両ビーズから、 $\alpha 2 \cdot 1$ g G重鎖- $\beta 1 \cdot 1$ g G重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体構造から期待される同一の沈降パターンが得られた。この結果は、実施例 14 (3) で得た溶出蛋白質が確かに $\alpha 2 \cdot 1$ g G重鎖- $\beta 1 \cdot 1$ g G重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体であることを示すとともに、実施例 14 (4) の結果とあわせて、両蛋白質の会合が1 g G重鎖間のジスルフィド結合を介した安定な会合であることを強く示唆している。

実施例 16

コラーゲンに対する $\alpha 2 \cdot 1$ g G重鎖- $\beta 1 \cdot 1$ g G重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合性と特異性の検討

インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ のリガンドであるコラーゲンに対する $\alpha 2 \cdot 1$ g G重鎖- $\beta 1 \cdot 1$ g G重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合性について検討した。

まず、コラーゲン(Cell matrix Type I 3 mg/ml)を0.02 M酢酸溶液で0.1 μ g/mlとなるように希釈し、イムノプレートに100 μ l/ウェル入れて4℃、16時間保温した。保温後、コラーゲン溶液を吸引除去し、PBS(-)で2回洗浄して中和し、熱変性1%BSA-PBS溶液を300 μ l/ウェル入れ、室温で3時間ブロッキングした。ブロッキング後、PBS(-)で2

度リンスして、コラーゲンコートプレートを作製した。

$\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を含む CHO 培養上清 ($100 \mu\text{l}$) を 30°C 、3 時間反応させた。反応後、実施例 9 と同様に、 $\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合量を測定した。

その結果、図 4 に示すように、 $\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とコラーゲンの結合を示す吸光度の上昇が認められた。この結合は、各 $10 \mu\text{g/ml}$ の抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体 (クローン P1E6) と抗インテグリン $\beta 1$ 抗体 (クローン 4B4) の共存下、および 5 mM EDTA の存在下ではほぼ完全に阻害された。この結果は、 $\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が、細胞膜表面に存在するインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ と同様にコラーゲンに対する結合性をもつことを示している。また、この結合が $\alpha 2 \beta 1$ 特異的であること、陽イオン依存性という結合の特徴を維持していることを示す。

実施例 17

$\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体への結合性ペプチドの取得とその阻害活性の評価

まず、実施例 6 において精製した $\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体、またはヒト 1 g G を PBS (-) にて適当な濃度に調製し、それぞれ 4°C 、16 時間静置してプラスチックシャーレに固相化した。次に、報告 (Scott, J. K. and Smith, G. P. Science 249, 386-390 (1990)) に従って、ランダムなアミノ酸 6 残基の両端をシステインのジスルフィド結合で環化させたファージペプチドライブラリーを作製し、0.1% BSA 含有 TBS 緩衝液に懸濁した。このファージペプチドライブラリーを、ヒト 1 g G と 30°C 、3 時間反応させて 1 g G に結合性をもつファージペプチドを吸収し、次に $\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と 30°C 、3 時間反応させたのち、0.1% BSA 含有 TBS 緩衝液により 2 回洗浄してヘテロダイマー複合体に非結合性のファージペプチドを除去し、結合性のファージペプチドのみを 0.1 M グリシン - 塩酸 (pH 2.2) にて溶出後回収した。回収後、このファージを増幅し、前述の結合操作をさらに 2 回繰り返してヘテロダイ

マー複合体に結合性のファージペプチドのみを選択的に濃縮した。最終の溶出操作では、ヘテロダイマー複合体に結合性のファージペプチドを、10 mM EDTA または 0.1 M グリシン-塩酸を用いて2段階で溶出後、各ペプチドのアミノ酸配列を解析した。そのうち、8つの配列（配列番号24～31）を表1に示した。さらに、実施例9の結合測定系にて検討し、結合阻害活性を示した4つのペプチド配列のIC50値を表1に示した。

表 1

| 溶出条件 | 配列 | 阻害活性 IC50 (μM) | 配列番号 |
|---------|-----------------------------------|-------------------|------|
| E D T A | Cys* Ile Pro Glu Leu Ile Val Cys* | 1. 2 | 2 4 |
| | Cys* Met Arg Tyr Thr Ser Ala Cys* | 2. 3 | 2 5 |
| | Cys* Glu Trp Met Lys Arg Phe Cys* | | 2 6 |
| | Cys* Tyr Thr Thr Arg Leu Lys Cys* | | 2 7 |
| グリシン-塩酸 | Cys* Leu Arg Tyr Ser Val Pro Cys* | 1. 8 | 2 8 |
| | Cys* Ile Val Asn Arg Leu Gly Cys* | | 2 9 |
| | Cys* Gly Leu Gln Ala Leu Pro Cys* | 1 0 | 3 0 |
| | Cys* Lys Leu Lys Gly Thr Met Cys* | | 3 1 |

Cys*Cys*は、ジスルフィド結合を示す

実施例 1 8

フィブロネクチン上のペプチド断片と $\alpha 4 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合を阻害する低分子化合物の取得

試薬および文献の化合物をランダムにピックアップし、最終濃度 50 または 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように調製して実施例9の結合測定系に加えたところ、阻害活性を示す化合物を得た。得られた化合物のうち、Norethynodrel (Sigma)、D-Penicillamine (Aldrich, Weigert, W.M. et al. Angew. Chem. In

t. Ed. Eng. 14, 330-336 (1975)), γ -2-Naphthyl butyric acid (Fieser, L. F. J. Am. Chem. Soc. 70, 3197-3203 (1948)), 1-Adamantaneacetic acid (Alldrich) の4つの結合阻害活性を表2に示した。

表 2

| 化合物名 | 濃度 (μ g / ml) | 阻害率 (%) |
|-----------------------------------|--------------------|---------|
| Norethynodrel | 50 | 28 |
| D-Penicillamine | 50 | 51 |
| γ -2-Naphthyl butyric acid | 100 | 37 |
| 1-Adamantaneacetic acid | 100 | 65 |

実施例 19

$\alpha 2 \cdot 1$ g G 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1$ g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームの作製

Martinらの方法 (Martin, F.J. et al. Biochemistry. 20, 4229, (1981))に従ってリポソームを作製した。まず、ジパミルトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE, Sigma) に二架橋試薬 N スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ) プロピオネート (SDPD, Sigma) を用いて活性化 SH 基を導入し、ピリジルジチオプロピオニルジパミルトイルホスファチジルエタノールアミン (PDP-DPPE) を作製した。この PDP-DPPE と、ジパミルトイルホスファチジルコリン (DPPC)、コレステロールを混合して脂質フィルムを調製したのち、ソニケーターにて処理し、濾過フィルターを用いて粒径の均一なリポソームを得た (PDP-DPPE リポソーム)。次に、 $\alpha 2 \cdot 1$ g G 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1$ g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体と、陰性コントロールとして用いるヒト IgG (Cappel) を HEPES 緩衝液 (100mM Hepes, 150mM NaCl pH8.0) に溶解し、SDPDを加えて30分間反応させた後、反応液を PD-10 カラム (ファルマシア) にアプライし、0.1M 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液 (p

H5.5) で溶出した。溶出液に、ジチオスライトールを加えて20分間処理後、再度PD-10カラムにアプライし、Hepes緩衝液(100mM Hepes、150mM NaCl pH8.0)で溶出し、SDPD修飾 $\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を得た。このSDPD修飾したヘテロダイマー複合体とPDPEリポソームを室温で24時間反応させ、セファロース4Bカラム(Sigma)で分離し、ピーク分画から $\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームを得た。

リポソーム上の $\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の結合量は、SDS-PAGE/クマシー染色後、デンストメーター(ATTO)により定量し、最終濃度1mg/mlとした。

実施例 20

$\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームのフローサイトメトリー解析

$\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームを1mMEDTA含有PBS(-)に分散したのち、抗ヒトインテグリン $\alpha 2$ 抗体(クローンP1E6)または抗ヒトインテグリン $\beta 1$ 抗体(クローン4B4)と室温で30分間反応させた。反応後、15000rpmで10分間遠心分離し、1mMEDTA含有PBS(-)で洗浄後、同溶液に再度懸濁した。これに、2次抗体として、FITC標識抗マウスIgG抗体(Cappel 10 $\mu\text{g/ml}$)を入れて室温で30分間反応させた。反応後、同様に遠心分離により洗浄し、フローサイトメトリー(ELITE、Coulter)にて測定した。

その結果、両抗体に対する陽性反応を確認し、リポソーム上に $\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が結合していることを確認した。

実施例 21

$\alpha 2 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖- $\beta 1 \cdot 1 \text{ g G}$ 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームのコラーゲンへの結合活性

コラーゲン(Cell matrix TypeI 3mg/ml)を0.02M酢酸溶液で希釈し、イムノプレートに100 μl /ウェル入れ、4℃、16時間保温した。保温後、コラーゲン溶液を吸引除去し、PBS(-)で2回洗浄して中和し、熱変性

1% BSA-PBS 溶液を 300 μ l / ウェル入れ、室温で 3 時間ブロッキングした。ブロッキング後、PBS (-) で 2 度リンスして、コラーゲンコートプレートを作製した。

正常ヒト血漿（ジョージ・キング社）、およびフォンビルブランドファクター欠乏（シビアー）血漿（ジョージ・キング社）を抗ヒト IgG 抗体とプロテイン A により吸収処理したのち、PBS (-) に対して 24 時間透析し、含有されているクエン酸ナトリウムを除去した。使用時に、Ca イオンおよび Mg イオン濃度を血液中の生理的陽イオン濃度条件とするため、最終濃度 CaCl₂ を 1.2 mM、MgCl₂ を 0.2 mM となるように加えた。陽イオン濃度を調整したのちの正常ヒト血漿、およびフォンビルブランドファクター欠乏血漿に $\alpha 2 \cdot 1$ g G 重鎖- $\beta 1 \cdot 1$ g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームまたはヒト IgG リポソームが 1 ~ 100 ng / ml 蛋白濃度となるように懸濁した。この懸濁液をコラーゲンコートプレートに、100 μ l / well ずつ入れた。プレートを、プレートシェーカーを使用して 100 回転 / 分の振とう条件下、室温で 15 分間反応させた。反応後、非結合リポソームを PB 液（1.2 mM CaCl₂、0.2 mM MgCl₂、1% BSA 含有 PBS、pH 7.4）で洗浄除去し、1% グルタルアルデヒド-PBS で室温で 30 分間固定した。固定後、熱変性 BSA-PBS 溶液で室温 1 時間ブロッキングした。その後、実施例 16 に従って、1 次抗体としてビオチン標識抗ヒト IgG 抗体、2 次抗体としてアビジン標識西洋ワサビペルオキシダーゼと反応させた後、TBS 緩衝液で洗浄した。これに、基質としてオルトフェニレンジアミンを加え、発色後 490 nm で吸光度を測定した。5 mM EDTA 5 mM、抗インテグリン $\alpha 2$ 抗体（クローン P1E6、10 μ g / ml）と抗インテグリン $\beta 1$ 抗体（クローン 4B4、10 μ g / ml）共存下の効果を検討する際は、あらかじめリポソーム懸濁液と室温で 15 分間反応させた後、コラーゲンと反応させた。

結果を図 5 および図 6 に示す。正常ヒト血漿中では、陰性コントロールとするヒト IgG リポソームのコラーゲンへの結合は見られないが、 $\alpha 2 \cdot 1$ g G 重鎖- $\beta 1 \cdot 1$ g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リポソームのコラーゲンへの結合は濃度依存的に増加した。フォンビルブランドファクター欠乏血漿を用いた場合も同等に結合した。さらに、正常血漿中に $\alpha 2 \cdot 1$ g G 重鎖- $\beta 1 \cdot 1$

g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リボソームを 30 ng/ml 加えた場合に見られるコラーゲンへの結合は、陽イオンキレート剤である EDTA および抗体の添加により完全に阻害された。この結果は、生理的な陽イオン条件の血漿中において $\alpha 2 \cdot 1$ g G 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1$ g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リボソームが血小板同様にコラーゲンに結合することを示しており、粘着血小板の代替物となりうること、コラーゲン露出部位のモニタリング試薬になりうることを強く示唆した。さらに、フォンビルブランドファクター欠乏血漿中でも同等の結合活性を示すことから、フォンビルブランド病などの凝固異常を伴う血漿中でも利用可能であることを示している。

実施例 2 2

$\alpha 2 \cdot 1$ g G 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1$ g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リボソームによるコラーゲン被覆状態の解析

ラボテクチャンバースライド（インターメッド、8 ウェル型、プラスチック製）のウェルの中央にコラーゲン溶液 5 μ l をスポットして 16 時間静置後、洗浄し、ブロッキング処理をした。次に、このスライドに、実施例 2 1 に準じて正常ヒト血漿に $\alpha 2 \cdot 1$ g G 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1$ g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リボソームを 30 ng/ml 蛋白濃度となるように懸濁し、200 μ l / ウェルずつ入れ、同条件で反応させた。反応後、非結合リボソームを PB 緩衝液で洗浄除去し、固定後、ブロッキング処理した。次に、1 次抗体としてビオチン標識抗ヒト 1 g G 抗体、2 次抗体としてアビジン標識西洋ワサビペルオキシダーゼと結合させた後、TBS 緩衝液で洗浄した。洗浄後、ジアミノベンチジンを加えて染色し、コラーゲン上に結合した $\alpha 2 \cdot 1$ g G 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1$ g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リボソームの被覆状態を観察した。

ヒト 1 g G リボソームでは、コラーゲンコート部の着色が認められないが、 $\alpha 2 \cdot 1$ g G 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1$ g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リボソームでは、コラーゲンコート部全体の着色が認められた。従って、 $\alpha 2 \cdot 1$ g G 重鎖 - $\beta 1 \cdot 1$ g G 重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体リボソームは、コラーゲンコート部分のみを被覆し、粘着血小板の代替物となることを強く示唆した。

産業上の利用可能性

本発明により、インテグリンの α 鎖と β 鎖とが安定に会合したインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が得られた。得られたインテグリン-免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体はそのまま医薬として利用可能であるばかりでなく、インテグリンとリガンドとの結合の測定、インテグリンに結合する物質やインテグリンとリガンドとの結合を阻害する物質の探索に利用できる。さらには診断薬にも利用できる。

さらに、これらのヘテロダイマー複合体、中でもインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体は血小板の代替物として利用できる。また、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ -免疫グロブリンキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体は、血小板減少症または血小板機能異常症などに伴う出血傾向の治療・予防薬として利用できる。さらに、細胞外マトリックスの露出部位のモニタリング試薬やターゲッティング療法にも利用できる。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 4228

配列の型 : 核酸

配列

| | |
|---|-----|
| ATG TTC CCC ACC GAG AGC GCA TGG CTT GGG AAG CGA GGC GCG AAC CCG | 48 |
| Met Phe Pro Thr Glu Ser Ala Trp Leu Gly Lys Arg Gly Ala Asn Pro | |
| -35 -30 -25 | |
| GGC CCC GAA GCT GCA CTC CGG GAG ACG GTG ATG CTG TTG CTG TGC CTG | 96 |
| Gly Pro Glu Ala Ala Leu Arg Glu Thr Val Met Leu Leu Leu Cys Leu | |
| -20 -15 -10 | |
| GGG GTC CCG ACC GGC AGG CCT TAC AAC GTG GAC ACT GAG AGC GCG CTG | 144 |
| Gly Val Pro Thr Gly Arg Pro Tyr Asn Val Asp Thr Glu Ser Ala Leu | |
| -5 1 5 | |
| CTT TAC CAG GGC CCC CAC AAC ACG CTG TTC GGC TAC TCG GTC GTG CTG | 192 |
| Leu Tyr Gln Gly Pro His Asn Thr Leu Phe Gly Tyr Ser Val Val Leu | |
| 10 15 20 25 | |
| CAC AGC CAC GGG GCG AAC CGA TGG CTC CTA GTG GGT GCG CCC ACT GCC | 240 |
| His Ser His Gly Ala Asn Arg Trp Leu Leu Val Gly Ala Pro Thr Ala | |
| 30 35 40 | |
| AAC TGG CTC GCC AAC GCT TCA GTG ATC AAT CCC GGG GCG ATT TAC AGA | 288 |
| Asn Trp Leu Ala Asn Ala Ser Val Ile Asn Pro Gly Ala Ile Tyr Arg | |
| 45 50 55 | |
| TGC AGG ATC GGA AAG AAT CCC GGC CAG ACG TGC GAA CAG CTC CAG CTG | 336 |
| Cys Arg Ile Gly Lys Asn Pro Gly Gln Thr Cys Glu Gln Leu Gln Leu | |
| 60 65 70 | |
| GGT AGC CCT AAT GGA GAA CCT TGT GGA AAG ACT TGT TTG GAA GAG AGA | 384 |
| Gly Ser Pro Asn Gly Glu Pro Cys Gly Lys Thr Cys Leu Glu Glu Arg | |
| 75 80 85 | |

| | |
|---|-----|
| GAC AAT CAG TGG TTG GGG GTC ACA CTT TCC AGA CAG CCA GGA GAA AAT | 432 |
| Asp Asn Gln Trp Leu Gly Val Thr Leu Ser Arg Gln Pro Gly Glu Asn | |
| 90 95 100 105 | |
| GGA TCC ATC GTG ACT TGT GGG CAT AGA TGG AAA AAT ATA TTT TAC ATA | 480 |
| Gly Ser Ile Val Thr Cys Gly His Arg Trp Lys Asn Ile Phe Tyr Ile | |
| 110 115 120 | |
| AAG AAT GAA AAT AAG CTC CCC ACT GGT GGT TGC TAT GGA GTG CCC CCT | 528 |
| Lys Asn Glu Asn Lys Leu Pro Thr Gly Gly Cys Tyr Gly Val Pro Pro | |
| 125 130 135 | |
| GAT TTA CGA ACA GAA CTG AGT AAA AGA ATA GCT CCG TGT TAT CAA GAT | 576 |
| Asp Leu Arg Thr Glu Leu Ser Lys Arg Ile Ala Pro Cys Tyr Gln Asp | |
| 140 145 150 | |
| TAT GTG AAA AAA TTT GGA GAA AAT TTT GCA TCA TGT CAA GCT GGA ATA | 624 |
| Tyr Val Lys Lys Phe Gly Glu Asn Phe Ala Ser Cys Gln Ala Gly Ile | |
| 155 160 165 | |
| TCC AGT TTT TAC ACA AAG GAT TTA ATT GTG ATG GGG GCC CCA GGA TCA | 672 |
| Ser Ser Phe Tyr Thr Lys Asp Leu Ile Val Met Gly Ala Pro Gly Ser | |
| 170 175 180 185 | |
| TCT TAC TGG ACT GGC TCT CTT TTT GTC TAC AAT ATA ACT ACA AAT AAA | 720 |
| Ser Tyr Trp Thr Gly Ser Leu Phe Val Tyr Asn Ile Thr Thr Asn Lys | |
| 190 195 200 | |
| TAC AAG GCT TTT TTA GAC AAA CAA AAT CAA GTA AAA TTT GGA AGT TAT | 768 |
| Tyr Lys Ala Phe Leu Asp Lys Gln Asn Gln Val Lys Phe Gly Ser Tyr | |
| 205 210 215 | |
| TTA GGA TAT TCA GTC GGA GCT GGT CAT TTT CGG AGC CAG CAT ACT ACC | 816 |
| Leu Gly Tyr Ser Val Gly Ala Gly His Phe Arg Ser Gln His Thr Thr | |
| 220 225 230 | |
| GAA GTA GTC GGA GGA GCT CCT CAA CAT GAG CAG ATT GGT AAG GCA TAT | 864 |
| Glu Val Val Gly Gly Ala Pro Gln His Glu Gln Ile Gly Lys Ala Tyr | |
| 235 240 245 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| ATA | TTC | AGC | ATT | GAT | GAA | AAA | GAA | CTA | AAT | ATC | TTA | CAT | GAA | ATG | AAA | 912 |
| Ile | Phe | Ser | Ile | Asp | Glu | Lys | Glu | Leu | Asn | Ile | Leu | His | Glu | Met | Lys | |
| 250 | | | | | 255 | | | | 260 | | | | | 265 | | |
| GGT | AAA | AAG | CTT | GGA | TCG | TAC | TTT | GGA | GCT | TCT | GTC | TGT | GCT | GTG | GAC | 960 |
| Gly | Lys | Lys | Leu | Gly | Ser | Tyr | Phe | Gly | Ala | Ser | Val | Cys | Ala | Val | Asp | |
| | | | 270 | | | | | 275 | | | | | | 280 | | |
| CTC | AAT | GCA | GAT | GGC | TTC | TCA | GAT | CTG | CTC | GTG | GGA | GCA | CCC | ATG | CAG | 1008 |
| Leu | Asn | Ala | Asp | Gly | Phe | Ser | Asp | Leu | Leu | Val | Gly | Ala | Pro | Met | Gln | |
| | | 285 | | | | | | 290 | | | | | | 295 | | |
| AGC | ACC | ATC | AGA | GAG | GAA | GGA | AGA | GTG | TTT | GTG | TAC | ATC | AAC | TCT | GGC | 1056 |
| Ser | Thr | Ile | Arg | Glu | Glu | Gly | Arg | Val | Phe | Val | Tyr | Ile | Asn | Ser | Gly | |
| | 300 | | | | | | 305 | | | | | 310 | | | | |
| TCG | GGA | GCA | GTA | ATG | AAT | GCA | ATC | GAA | ACA | AAC | CTC | GTT | GGA | AGT | GAC | 1104 |
| Ser | Gly | Ala | Val | Met | Asn | Ala | Met | Glu | Thr | Asn | Leu | Val | Gly | Ser | Asp | |
| | 315 | | | | | 320 | | | | | 325 | | | | | |
| AAA | TAT | GCT | GCA | AGA | TTT | GGG | GAA | TCT | ATA | GTT | AAT | CTT | GGC | GAC | ATT | 1152 |
| Lys | Tyr | Ala | Ala | Arg | Phe | Gly | Glu | Ser | Ile | Val | Asn | Leu | Gly | Asp | Ile | |
| 330 | | | | | 335 | | | | 340 | | | | | 345 | | |
| GAC | AAT | GAT | GGC | TTT | GAA | GAT | GTT | GCT | ATC | GGA | GCT | CCA | CAA | GAA | GAT | 1200 |
| Asp | Asn | Asp | Gly | Phe | Glu | Asp | Val | Ala | Ile | Gly | Ala | Pro | Gln | Glu | Asp | |
| | | | 350 | | | | | 355 | | | | | | 360 | | |
| GAC | TTG | CAA | GGT | GCT | ATT | TAT | ATT | TAC | AAT | GGC | CGT | GCA | GAT | GGG | ATC | 1248 |
| Asp | Leu | Gln | Gly | Ala | Ile | Tyr | Ile | Tyr | Asn | Gly | Arg | Ala | Asp | Gly | Ile | |
| | | 365 | | | | | | 370 | | | | | | 375 | | |
| TCG | TCA | ACC | TTC | TCA | CAG | AGA | ATT | GAA | GGA | CTT | CAG | ATC | AGC | AAA | TCG | 1296 |
| Ser | Ser | Thr | Phe | Ser | Gln | Arg | Ile | Glu | Gly | Leu | Gln | Ile | Ser | Lys | Ser | |
| | 380 | | | | | | 385 | | | | | 390 | | | | |
| TTA | AGT | ATG | TTT | GGA | CAG | TCT | ATA | TCA | GGA | CAA | ATT | GAT | GCA | GAT | AAT | 1344 |
| Leu | Ser | Met | Phe | Gly | Gln | Ser | Ile | Ser | Gly | Gln | Ile | Asp | Ala | Asp | Asn | |
| 395 | | | | | 400 | | | | | | 405 | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| AAT | GGC | TAT | GTA | GAT | GTA | GCA | GTT | GGT | GCT | TTT | CGG | TCT | GAT | TCT | GCT | 1392 |
| Asn | Gly | Tyr | Val | Asp | Val | Ala | Val | Gly | Ala | Phe | Arg | Ser | Asp | Ser | Ala | |
| 410 | | | | | 415 | | | | | 420 | | | | | 425 | |
| GTC | TTG | CTA | AGG | ACA | AGA | CCT | GTA | GTA | ATT | GTT | GAC | GCT | TCT | TTA | AGC | 1440 |
| Val | Leu | Leu | Arg | Thr | Arg | Pro | Val | Val | Ile | Val | Asp | Ala | Ser | Leu | Ser | |
| | | | | 430 | | | | | 435 | | | | | 440 | | |
| CAC | CCT | GAG | TCA | GTA | AAT | AGA | ACG | AAA | TTT | GAC | TGT | GTT | GAA | AAT | GGA | 1488 |
| His | Pro | Glu | Ser | Val | Asn | Arg | Thr | Lys | Phe | Asp | Cys | Val | Glu | Asn | Gly | |
| | | | 445 | | | | | 450 | | | | | 455 | | | |
| TGG | CCT | TCT | GTG | TGC | ATA | GAT | CTA | ACA | CTT | TGT | TTC | TCA | TAT | AAG | GGC | 1536 |
| Trp | Pro | Ser | Val | Cys | Ile | Asp | Leu | Thr | Leu | Cys | Phe | Ser | Tyr | Lys | Gly | |
| | 460 | | | | | | 465 | | | | | 470 | | | | |
| AAG | GAA | GTT | CCA | GGT | TAC | ATT | GTT | TTG | TTT | TAT | AAC | ATG | AGT | TTG | GAT | 1584 |
| Lys | Glu | Val | Pro | Gly | Tyr | Ile | Val | Leu | Phe | Tyr | Asn | Met | Ser | Leu | Asp | |
| | 475 | | | | | 480 | | | | | 485 | | | | | |
| GTG | AAC | AGA | AAG | GCA | GAG | TCT | CCA | CCA | AGA | TTC | TAT | TTC | TCT | TCT | AAT | 1632 |
| Val | Asn | Arg | Lys | Ala | Glu | Ser | Pro | Pro | Arg | Phe | Tyr | Phe | Ser | Ser | Asn | |
| 490 | | | | | 495 | | | | | 500 | | | | | 505 | |
| GGA | ACT | TCT | GAC | GTG | ATT | ACA | GGA | AGC | ATA | CAG | GTG | TCC | AGC | AGA | GAA | 1680 |
| Gly | Thr | Ser | Asp | Val | Ile | Thr | Gly | Ser | Ile | Gln | Val | Ser | Ser | Arg | Glu | |
| | | | | 510 | | | | | 515 | | | | | 520 | | |
| GCT | AAC | TGT | AGA | ACA | CAT | CAA | GCA | TTT | ATG | CGG | AAA | GAT | GTG | CGG | GAC | 1728 |
| Ala | Asn | Cys | Arg | Thr | His | Gln | Ala | Phe | Met | Arg | Lys | Asp | Val | Arg | Asp | |
| | | | 525 | | | | | 530 | | | | | 535 | | | |
| ATC | CTC | ACC | CCA | ATT | CAG | ATT | GAA | GCT | GCT | TAC | CAC | CTT | GGT | CCT | CAT | 1776 |
| Ile | Leu | Thr | Pro | Ile | Gln | Ile | Glu | Ala | Ala | Tyr | His | Leu | Gly | Pro | His | |
| | 540 | | | | | | 545 | | | | | 550 | | | | |
| GTC | ATC | AGT | AAA | CGA | AGT | ACA | GAG | GAA | TTC | CCA | CCA | CTT | CAG | CCA | ATT | 1824 |
| Val | Ile | Ser | Lys | Arg | Ser | Thr | Glu | Glu | Phe | Pro | Pro | Leu | Gln | Pro | Ile | |
| 555 | | | | | | 560 | | | | | 565 | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| CTT | CAG | CAG | AAG | AAA | GAA | AAA | GAC | ATA | ATG | AAA | AAA | ACA | ATA | AAC | TTT | 1872 |
| Leu | Gln | Gln | Lys | Lys | Glu | Lys | Asp | Ile | Met | Lys | Lys | Thr | Ile | Asn | Phe | |
| 570 | | | | | 575 | | | | | 580 | | | | | 585 | |
| GCA | AGG | TTT | TGT | GCC | CAT | GAA | AAT | TGT | TCT | GCT | GAT | TTA | CAG | GTT | TCT | 1920 |
| Ala | Arg | Phe | Cys | Ala | His | Glu | Asn | Cys | Ser | Ala | Asp | Leu | Gln | Val | Ser | |
| | | | | 590 | | | | | 595 | | | | | | 600 | |
| GCA | AAG | ATT | GGG | TTT | TTG | AAG | CCC | CAT | GAA | AAT | AAA | ACA | TAT | CTT | GCT | 1968 |
| Ala | Lys | Ile | Gly | Phe | Leu | Lys | Pro | His | Glu | Asn | Lys | Thr | Tyr | Leu | Ala | |
| | | | 605 | | | | | 610 | | | | | | 615 | | |
| GTT | GGG | AGT | ATG | AAG | ACA | TTG | ATG | TTG | AAT | GTG | TCC | TTG | TTT | AAT | GCT | 2016 |
| Val | Gly | Ser | Met | Lys | Thr | Leu | Met | Leu | Asn | Val | Ser | Leu | Phe | Asn | Ala | |
| | | | 620 | | | | | 625 | | | | | | 630 | | |
| GGA | GAT | GAT | GCA | TAT | GAA | ACG | ACT | CTA | CAT | GTC | AAA | CTA | CCC | GTG | GGT | 2064 |
| Gly | Asp | Asp | Ala | Tyr | Glu | Thr | Thr | Leu | His | Val | Lys | Leu | Pro | Val | Gly | |
| | | | 635 | | | | | 640 | | | | | | 645 | | |
| CTT | TAT | TTC | ATT | AAG | ATT | TTA | GAG | CTG | GAA | GAG | AAG | CAA | ATA | AAC | TGT | 2112 |
| Leu | Tyr | Phe | Ile | Lys | Ile | Leu | Glu | Leu | Glu | Glu | Lys | Gln | Ile | Asn | Cys | |
| 650 | | | | | 655 | | | | | 660 | | | | | 665 | |
| GAA | GTC | ACA | GAT | AAC | TCT | GGC | GTG | GTA | CAA | CTT | GAC | TGC | AGT | ATT | GGC | 2160 |
| Glu | Val | Thr | Asp | Asn | Ser | Gly | Val | Val | Gln | Leu | Asp | Cys | Ser | Ile | Gly | |
| | | | | 670 | | | | | 675 | | | | | | 680 | |
| TAT | ATA | TAT | GTA | GAT | CAT | CTC | TCA | AGG | ATA | GAT | ATT | AGC | TTT | CTC | CTG | 2208 |
| Tyr | Ile | Tyr | Val | Asp | His | Leu | Ser | Arg | Ile | Asp | Ile | Ser | Phe | Leu | Leu | |
| | | | | 685 | | | | | 690 | | | | | | 695 | |
| GAT | GTG | AGC | TCA | CTC | AGC | AGA | GCG | GAA | GAG | GAC | CTC | AGT | ATC | ACA | GTG | 2256 |
| Asp | Val | Ser | Ser | Leu | Ser | Arg | Ala | Glu | Glu | Asp | Leu | Ser | Ile | Thr | Val | |
| | | | | 700 | | | | | 705 | | | | | 710 | | |
| CAT | GCT | ACC | TGT | GAA | AAT | GAA | GAG | GAA | ATG | GAC | AAT | CTA | AAG | CAC | AGC | 2304 |
| His | Ala | Thr | Cys | Glu | Asn | Glu | Glu | Glu | Met | Asp | Asn | Leu | Lys | His | Ser | |
| | | | | 715 | | | | | 720 | | | | | | 725 | |

47

CCA TCC ATT TTA GAA ATG GAT GAG ACT TCA GCA CTC AAG TTT GAA ATA 2832
 Pro Ser Ile Leu Glu Met Asp Glu Thr Ser Ala Leu Lys Phe Glu Ile
 890 895 900 905
 AGA GCA ACA GGT TTT CCA GAG CCA AAT CCA AGA GTA ATT GAA CTA AAC 2880
 Arg Ala Thr Gly Phe Pro Glu Pro Asn Pro Arg Val Ile Glu Leu Asn
 910 915 920
 AAG GAT GAG AAT GTT GCG CAT GTT CTA CTG GAA GGA CTA CAT CAT CAA 2928
 Lys Asp Glu Asn Val Ala His Val Leu Leu Glu Gly Leu His His Gln
 925 930 935
 AGA CCC AAA CGT TAT TTC ACG GAT CCC GAG CTGCTGGAAG CAGGCTCAGC 2978
 Arg Pro Lys Arg Tyr Phe Thr Asp Pro Glu
 940 945
 GCTCCTGCCT GGACGCATCC CGGCTATGCA GCCCCAGTCC AGGGCAGCAA GGCAGGCCCC 3038
 GTCTGCCTCT TCACCCGGAG CCTCTGCCCC CCCCCTCAT GCTCAGGGAG AGGGTCTTCT 3098
 GGCTTTTTCC CAGGCTCTGG GCAGGCACAG GCTAGGTGCC CCTAAGCCAG GCCCTGCACA 3158
 CAAAGGGGCA GGTGCTGGGC TCAGACCTGC CAAGAGCCAT ATCCGGGAGG ACCCTGCCCC 3218
 TGACCTAAGC CCACCCCAAA GGCCAACTC TCCACTCCCT CAGCTCGGAC ACCTTCTCTC 3278
 CTCCCAGATT CCAGTAACTC CCAATCTTCT CTCTGCA GAG CCC AAA TCT TGT GAC 3333
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 950
 AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GGTAAGCCAG CCCAGGCCTC 3380
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 955 960
 GCCCTCCAGC TCAAGGCGGG ACAGGTGCCC TAGAGTAGCC TGCATCCAGG GACAGGCCCC 3440
 AGCCGGGTGC TGACACGTCC ACCTCCATCT CTTCCTCA GCA CCT GAA CTC CTG 3493
 Ala Pro Glu Leu Leu
 965
 GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC 3541
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 970 975 980

ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC 3589
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 985 990 995
 CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG 3637
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 1000 1005 1010 1015
 GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG 3685
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 1020 1025 1030
 TAC CGG GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT 3733
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 1035 1040 1045
 GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC 3781
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 1050 1055 1060
 ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGTGGGACCC GTGGGGTGCG 3828
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 1065 1070
 AGGGCCACAT GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCCTCTGC CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC 3888
 CAACCTCTGT CCTACA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG 3937
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 1075 1080
 CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC 3985
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 1085 1090 1095
 CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC 4033
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 1100 1105 1110 1115

| | |
|---|------|
| AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAT | 4081 |
| Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp | |
| 1120 1125 1130 | |
| TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC | 4129 |
| Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser | |
| 1135 1140 1145 | |
| AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT | 4177 |
| Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala | |
| 1150 1155 1160 | |
| CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA | 4225 |
| Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys | |
| 1165 1170 1175 | |
| TGA | 4228 |

配列番号 : 2

配列の長さ : 3463

配列の型 : 核酸

配列

| | |
|---|-----|
| ATG AAT TTA CAA CCA ATT TTC TGG ATT GGA CTG ATC AGT TCA GTT TGC | 48 |
| Met Asn Leu Gln Pro Ile Phe Trp Ile Gly Leu Ile Ser Ser Val Cys | |
| -20 -15 -10 -5 | |
| TGT GTG TTT GCT CAA ACA GAT GAA AAT AGA TGT TTA AAA GCA AAT GCC | 96 |
| Cys Val Phe Ala Gln Thr Asp Glu Asn Arg Cys Leu Lys Ala Asn Ala | |
| 1 5 10 | |
| AAA TCA TGT GGA GAA TGT ATA CAA GCA GGG CCA AAT TGT GGG TGG TGC | 144 |
| Lys Ser Cys Gly Glu Cys Ile Gln Ala Gly Pro Asn Cys Gly Trp Cys | |
| 15 20 25 | |
| ACA AAT TCA ACA TTT TTA CAG GAA GGA ATG CCT ACT TCT GCA CGA TGT | 192 |
| Thr Asn Ser Thr Phe Leu Gln Glu Gly Met Pro Thr Ser Ala Arg Cys | |
| 30 35 40 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| GAT | GAT | TTA | GAA | GCC | TTA | AAA | AAG | AAG | GGT | TGC | CCT | CCA | GAT | GAC | ATA | 240 |
| Asp | Asp | Leu | Glu | Ala | Leu | Lys | Lys | Lys | Gly | Cys | Pro | Pro | Asp | Asp | Ile | |
| 45 | | | | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | |
| GAA | AAT | CCC | AGA | GGC | TCC | AAA | GAT | ATA | AAG | AAA | AAT | AAA | AAT | GTA | ACC | 288 |
| Glu | Asn | Pro | Arg | Gly | Ser | Lys | Asp | Ile | Lys | Lys | Asn | Lys | Asn | Val | Thr | |
| | | | | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | |
| AAC | CGT | AGC | AAA | GGA | ACA | GCA | GAG | AAG | CTC | AAG | CCA | GAG | GAT | ATT | CAT | 336 |
| Asn | Arg | Ser | Lys | Gly | Thr | Ala | Glu | Lys | Leu | Lys | Pro | Glu | Asp | Ile | His | |
| | | | 80 | | | | | 85 | | | | | 90 | | | |
| CAG | ATC | CAA | CCA | CAG | CAG | TTG | GTT | TTG | CGA | TTA | AGA | TCA | GGG | GAG | CCA | 384 |
| Gln | Ile | Gln | Pro | Gln | Gln | Leu | Val | Leu | Arg | Leu | Arg | Ser | Gly | Glu | Pro | |
| | | 95 | | | | 100 | | | | | | 105 | | | | |
| CAG | ACA | TTT | ACA | TTA | AAA | TTC | AAG | AGA | GCT | GAA | GAC | TAT | CCC | ATT | GAC | 432 |
| Gln | Thr | Phe | Thr | Leu | Lys | Phe | Lys | Arg | Ala | Glu | Asp | Tyr | Pro | Ile | Asp | |
| | 110 | | | | | 115 | | | | | | 120 | | | | |
| CTC | TAC | TAC | CTT | ATG | GAC | CTG | TCT | TAT | TCA | ATG | AAA | GAC | GAT | TTG | GAG | 480 |
| Leu | Tyr | Tyr | Leu | Met | Asp | Leu | Ser | Tyr | Ser | Met | Lys | Asp | Asp | Leu | Glu | |
| 125 | | | | 130 | | | | | | 135 | | | | | 140 | |
| AAT | GTA | AAA | AGT | CTT | GGA | ACA | GAT | CTG | ATG | AAT | GAA | ATG | AGG | AGG | ATT | 528 |
| Asn | Val | Lys | Ser | Leu | Gly | Thr | Asp | Leu | Met | Asn | Glu | Met | Arg | Arg | Ile | |
| | | | 145 | | | | | | 150 | | | | 155 | | | |
| ACT | TCG | GAC | TTC | AGA | ATT | GGA | TTT | GGC | TCA | TTT | GTG | GAA | AAG | ACT | GTG | 576 |
| Thr | Ser | Asp | Phe | Arg | Ile | Gly | Phe | Gly | Ser | Phe | Val | Glu | Lys | Thr | Val | |
| | | 160 | | | | | | 165 | | | | 170 | | | | |
| ATG | CCT | TAC | ATT | AGC | ACA | ACA | CCA | GCT | AAG | CTC | AGG | AAC | CCT | TGC | ACA | 624 |
| Met | Pro | Tyr | Ile | Ser | Thr | Thr | Pro | Ala | Lys | Leu | Arg | Asn | Pro | Cys | Thr | |
| | | 175 | | | | | | 180 | | | | 185 | | | | |
| AGT | GAA | CAG | AAC | TGC | ACC | ACC | CCA | TTT | AGC | TAC | AAA | AAT | GTG | CTC | AGT | 672 |
| Ser | Glu | Gln | Asn | Cys | Thr | Thr | Pro | Phe | Ser | Tyr | Lys | Asn | Val | Leu | Ser | |
| 190 | | | | | | 195 | | | | | 200 | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| CTT | ACT | AAT | AAA | GGA | GAA | GTA | TTT | AAT | GAA | CTT | GTT | GGA | AAA | CAG | CGC | 720 |
| Leu | Thr | Asn | Lys | Gly | Glu | Val | Phe | Asn | Glu | Leu | Val | Gly | Lys | Gln | Arg | |
| 205 | | | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | |
| ATA | TCT | GGA | AAT | TTG | GAT | TCT | CCA | GAA | GGT | GGT | TTC | GAT | GCC | ATC | ATG | 768 |
| Ile | Ser | Gly | Asn | Leu | Asp | Ser | Pro | Glu | Gly | Gly | Phe | Asp | Ala | Ile | Met | |
| | | | 225 | | | | | 230 | | | | | | 235 | | |
| CAA | GTT | GCA | GTT | TGT | GGA | TCA | CTG | ATT | GGC | TGG | AGG | AAT | GTT | ACA | CGG | 816 |
| Gln | Val | Ala | Val | Cys | Gly | Ser | Leu | Ile | Gly | Trp | Arg | Asn | Val | Thr | Arg | |
| | | 240 | | | | | | 245 | | | | | 250 | | | |
| CTG | CTG | GTG | TTT | TCC | ACA | GAT | GCC | GGG | TTT | CAC | TTT | GCT | GGA | GAT | GGG | 864 |
| Leu | Leu | Val | Phe | Ser | Thr | Asp | Ala | Gly | Phe | His | Phe | Ala | Gly | Asp | Gly | |
| | | 255 | | | | | | 260 | | | | | 265 | | | |
| AAA | CTT | GGT | GGC | ATT | GTT | TTA | CCA | AAT | GAT | GGA | CAA | TGT | CAC | CTG | GAA | 912 |
| Lys | Leu | Gly | Gly | Ile | Val | Leu | Pro | Asn | Asp | Gly | Gln | Cys | His | Leu | Glu | |
| | 270 | | | | | | | 275 | | | | | 280 | | | |
| AAT | AAT | ATG | TAC | ACA | ATG | AGC | CAT | TAT | TAT | GAT | TAT | CCT | TCT | ATT | GCT | 960 |
| Asn | Asn | Met | Tyr | Thr | Met | Ser | His | Tyr | Tyr | Asp | Tyr | Pro | Ser | Ile | Ala | |
| 285 | | | | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | |
| CAC | CTT | GTC | CAG | AAA | CTG | AGT | GAA | AAT | AAT | ATT | CAG | ACA | ATT | TTT | GCA | 1008 |
| His | Leu | Val | Gln | Lys | Leu | Ser | Glu | Asn | Asn | Ile | Gln | Thr | Ile | Phe | Ala | |
| | | | 305 | | | | | | 310 | | | | | 315 | | |
| GTT | ACT | GAA | GAA | TTT | CAG | CCT | GTT | TAC | AAG | GAG | CTG | AAA | AAC | TTG | ATC | 1056 |
| Val | Thr | Glu | Glu | Phe | Gln | Pro | Val | Tyr | Lys | Glu | Leu | Lys | Asn | Leu | Ile | |
| | | 320 | | | | | | | 325 | | | | | 330 | | |
| CCT | AAG | TCA | GCA | GTA | GGA | ACA | TTA | TCT | GCA | AAT | TCT | AGC | AAT | GTA | ATT | 1104 |
| Pro | Lys | Ser | Ala | Val | Gly | Thr | Leu | Ser | Ala | Asn | Ser | Ser | Asn | Val | Ile | |
| | | 335 | | | | | | | 340 | | | | | 345 | | |
| CAG | TTG | ATC | ATT | GAT | GCA | TAC | AAT | TCC | CTT | TCC | TCA | GAA | GTC | ATT | TTG | 1152 |
| Gln | Leu | Ile | Ile | Asp | Ala | Tyr | Asn | Ser | Leu | Ser | Ser | Glu | Val | Ile | Leu | |
| | 350 | | | | | | | 355 | | | | | | 360 | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|------|--|--|-----|
| GAA | AAC | GGC | AAA | TTG | TCA | GAA | GGA | GTA | ACA | ATA | AGT | TAC | AAA | TCT | TAC | | 1200 | | | |
| Glu | Asn | Gly | Lys | Leu | Ser | Glu | Gly | Val | Thr | Ile | Ser | Tyr | Lys | Ser | Tyr | | | | | |
| | | | | | | 370 | | | | | | | 375 | | | | | | | 380 |
| TGC | AAG | AAC | GGG | GTG | AAT | GGA | ACA | GGG | GAA | AAT | GGA | AGA | AAA | TGT | TCC | | 1248 | | | |
| Cys | Lys | Asn | Gly | Val | Asn | Gly | Thr | Gly | Glu | Asn | Gly | Arg | Lys | Cys | Ser | | | | | |
| | | | | | | 385 | | | | | | | 390 | | | | | | | 395 |
| AAT | ATT | TCC | ATT | GGA | GAT | GAG | GTT | CAA | TTT | GAA | ATT | AGC | ATA | ACT | TCA | | 1296 | | | |
| Asn | Ile | Ser | Ile | Gly | Asp | Glu | Val | Gln | Phe | Glu | Ile | Ser | Ile | Thr | Ser | | | | | |
| | | | | | | 400 | | | | | | | 405 | | | | | | | 410 |
| AAT | AAG | TGT | CCA | AAA | AAG | GAT | TCT | GAC | AGC | TTT | AAA | ATT | AGG | CCT | CTG | | 1344 | | | |
| Asn | Lys | Cys | Pro | Lys | Lys | Asp | Ser | Asp | Ser | Phe | Lys | Ile | Arg | Pro | Leu | | | | | |
| | | | | | | 415 | | | | | | | 420 | | | | | | | 425 |
| GGC | TTT | ACG | GAG | GAA | GTA | GAG | GTT | ATT | CTT | CAG | TAC | ATC | TGT | GAA | TGT | | 1392 | | | |
| Gly | Phe | Thr | Glu | Glu | Val | Glu | Val | Ile | Leu | Gln | Tyr | Ile | Cys | Glu | Cys | | | | | |
| | | | | | | 430 | | | | | | | 435 | | | | | | | 440 |
| GAA | TGC | CAA | AGC | GAA | GGC | ATC | CCT | GAA | AGT | CCC | AAG | TGT | CAT | GAA | GGA | | 1440 | | | |
| Glu | Cys | Gln | Ser | Glu | Gly | Ile | Pro | Glu | Ser | Pro | Lys | Cys | His | Glu | Gly | | | | | |
| | | | | | | 445 | | | | | | | 450 | | | | | | | 455 |
| AAT | GGG | ACA | TTT | GAG | TGT | GGC | GCG | TGC | AGG | TGC | AAT | GAA | GGG | CGT | GTT | | 1488 | | | |
| Asn | Gly | Thr | Phe | Glu | Cys | Gly | Ala | Cys | Arg | Cys | Asn | Glu | Gly | Arg | Val | | | | | |
| | | | | | | 465 | | | | | | | 470 | | | | | | | 475 |
| GGT | AGA | CAT | TGT | GAA | TGC | AGC | ACA | GAT | GAA | GTT | AAC | AGT | GAA | GAC | ATG | | 1536 | | | |
| Gly | Arg | His | Cys | Glu | Cys | Ser | Thr | Asp | Glu | Val | Asn | Ser | Glu | Asp | Met | | | | | |
| | | | | | | 480 | | | | | | | 485 | | | | | | | 490 |
| GAT | GCT | TAC | TGC | AGG | AAA | GAA | AAC | AGT | TCA | GAA | ATC | TGC | AGT | AAC | AAT | | 1584 | | | |
| Asp | Ala | Tyr | Cys | Arg | Lys | Glu | Asn | Ser | Ser | Glu | Ile | Cys | Ser | Asn | Asn | | | | | |
| | | | | | | 495 | | | | | | | 500 | | | | | | | 505 |
| GGA | GAG | TGC | GTC | TGC | GGA | CAG | TGT | GTT | TGT | AGG | AAG | AGG | GAT | AAT | ACA | | 1632 | | | |
| Gly | Glu | Cys | Val | Cys | Gly | Gln | Cys | Val | Cys | Arg | Lys | Arg | Asp | Asn | Thr | | | | | |
| | | | | | | 510 | | | | | | | 515 | | | | | | | 520 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| AAT | GAA | ATT | TAT | TCT | GGC | AAA | TTC | TGC | GAG | TGT | GAT | AAT | TTC | AAC | TGT | 1680 |
| Asn | Glu | Ile | Tyr | Ser | Gly | Lys | Phe | Cys | Glu | Cys | Asp | Asn | Phe | Asn | Cys | |
| 525 | | | | | 530 | | | | 535 | | | | | 540 | | |
| GAT | AGA | TCC | AAT | GGC | TTA | ATT | TGT | GGA | GGA | AAT | GGT | GTT | TGC | AAG | TGT | 1728 |
| Asp | Arg | Ser | Asn | Gly | Leu | Ile | Cys | Gly | Gly | Asn | Gly | Val | Cys | Lys | Cys | |
| | | | | 545 | | | | 550 | | | | | 555 | | | |
| CGT | GTG | TGT | GAG | TGC | AAC | CCC | AAC | TAC | ACT | GGC | AGT | GCA | TGT | GAC | TGT | 1776 |
| Arg | Val | Cys | Glu | Cys | Asn | Pro | Asn | Tyr | Thr | Gly | Ser | Ala | Cys | Asp | Cys | |
| | | | 560 | | | | | 565 | | | | | 570 | | | |
| TCT | TTG | GAT | ACT | AGT | ACT | TGT | GAA | GCC | AGC | AAC | GGA | CAG | ATC | TGC | AAT | 1824 |
| Ser | Leu | Asp | Thr | Ser | Thr | Cys | Glu | Ala | Ser | Asn | Gly | Gln | Ile | Cys | Asn | |
| | | | 575 | | | | | 580 | | | | | 585 | | | |
| GGC | CGG | GGC | ATC | TGC | GAG | TGT | GGT | GTC | TGT | AAG | TGT | ACA | GAT | CCG | AAG | 1872 |
| Gly | Arg | Gly | Ile | Cys | Glu | Cys | Gly | Val | Cys | Lys | Cys | Thr | Asp | Pro | Lys | |
| | | | 590 | | | | | 595 | | | | | 600 | | | |
| TTT | CAA | GGG | CAA | ACG | TGT | GAG | ATG | TGT | CAG | ACC | TGC | CTT | GGT | GTC | TGT | 1920 |
| Phe | Gln | Gly | Gln | Thr | Cys | Glu | Met | Cys | Gln | Thr | Cys | Leu | Gly | Val | Cys | |
| 605 | | | | | 610 | | | | 615 | | | | | 620 | | |
| GCT | GAG | CAT | AAA | GAA | TGT | GTT | CAG | TGC | AGA | GCC | TTC | AAT | AAA | GGA | GAA | 1968 |
| Ala | Glu | His | Lys | Glu | Cys | Val | Gln | Cys | Arg | Ala | Phe | Asn | Lys | Gly | Glu | |
| | | | | 625 | | | | 630 | | | | | 635 | | | |
| AAG | AAA | GAC | ACA | TGC | ACA | CAG | GAA | TGT | TCC | TAT | TTT | AAC | ATT | ACC | AAG | 2016 |
| Lys | Lys | Asp | Thr | Cys | Thr | Gln | Glu | Cys | Ser | Tyr | Phe | Asn | Ile | Thr | Lys | |
| | | | 640 | | | | | 645 | | | | | 650 | | | |
| GTA | GAA | AGT | CGG | GAC | AAA | TTA | CCC | CAG | CCG | GTC | CAA | CCT | GAT | CCT | GTG | 2064 |
| Val | Glu | Ser | Arg | Asp | Lys | Leu | Pro | Gln | Pro | Val | Gln | Pro | Asp | Pro | Val | |
| | | | 655 | | | | | 660 | | | | | 665 | | | |
| TCC | CAT | TGT | AAG | GAG | AAG | GAT | GTT | GAC | GAC | TGT | TGG | TTC | TAT | TTT | ACG | 2112 |
| Ser | His | Cys | Lys | Glu | Lys | Asp | Val | Asp | Asp | Cys | Trp | Phe | Tyr | Phe | Thr | |
| | | | 670 | | | | | 675 | | | | | 680 | | | |

TAT TCA GTG AAT GGG AAC AAC GAG GTC ATG GTT CAT GTT GTG GAG AAT 2160
 Tyr Ser Val Asn Gly Asn Asn Glu Val Met Val His Val Val Glu Asn
 685 690 695 700
 CCA GAG TGT CCC ACT GGT CCA GAG GAT CCC GAG CTGCTGGAAG CAGGCTCAGC 2213
 Pro Glu Cys Pro Thr Gly Pro Glu Asp Pro Glu
 705 710
 GCTCCTGCCT GGACGCATCC CGGCTATGCA GCCCCAGTCC AGGGCAGCAA GGCAGGCCCC 2273
 GTCTGCCTCT TCACCCGGAG CCTCTGCCCC CCCCACATCAT GCTCAGGGAG AGGGTCTTCT 2333
 GGCTTTTTTCC CAGGCTCTGG GCAGGCACAG GCTAGGTGCC CCTAAGCCAG GCCCTGCACA 2393
 CAAAGGGGCA GGTGCTGGGC TCAGACCTGC CAAGAGCCAT ATCCGGGAGG ACCCTGCCCC 2453
 TGACCTAAGC CCACCCCAA GGCCTAACTC TCCACTCCCT CAGCTCGGAC ACCTTCTCTC 2513
 CTCCCAGATT CCAGTAACTC CCAATCTTCT CTCTGCA GAG CCC AAA TCT TGT GAC 2568
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 715
 AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GGTAAGCCAG CCCAGGCCTC 2615
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 720 725
 GCCCTCCAGC TCAAGGCGGG ACAGGTGCCC TAGAGTAGCC TGCATCCAGG GACAGGCCCC 2675
 AGCCGGGTGC TGACACGTCC ACCTCCATCT CTCCTCA GCA CCT GAA CTC CTG 2728
 Ala Pro Glu Leu Leu
 730
 GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC 2776
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 735 740 745
 ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC 2824
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 750 755 760
 CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG 2872
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 765 770 775

| | |
|--|------|
| GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG | 2920 |
| Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr | |
| 780 785 790 795 | |
| TAC CGG GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT | 2968 |
| Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn | |
| 800 805 810 | |
| GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC | 3016 |
| Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro | |
| 815 820 825 | |
| ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGTGGGACCC GTGGGGTGCG | 3063 |
| Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys | |
| 830 835 | |
| AGGGCCACAT GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCCTCTGC CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC | 3123 |
| CAACCTCTGT CCTACA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG | 3172 |
| Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu | |
| 840 845 | |
| CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC | 3220 |
| Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys | |
| 850 855 860 | |
| CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC | 3268 |
| Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser | |
| 865 870 875 | |
| AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAT | 3316 |
| Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp | |
| 880 885 890 895 | |
| TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC | 3364 |
| Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser | |
| 900 905 910 | |

AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT 3412
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 915 920 925
 CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA 3460
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 930 935 940
 TGA 3463

配列番号 : 3

配列の長さ : 13

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Cys Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr

1 5 10

配列番号 : 4

配列の長さ : 31

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GCGGATCCCG AGCTGCTGGA AGCAGGCTCA G 31

配列番号 : 5

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCTCTAGACG GCCGTCGCAC TCATTTA

27

配列番号：6

配列の長さ：73

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTAGACCACC ATGTTCCCA CCGAGAGCGC ATGGCTTGGG AAGCGAGGCG CGAACCCGGG
CCCCGGAGCT GCA

73

配列番号：7

配列の長さ：65

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCTTCGGGGC CCGGGTTCGC GCCTCGCTTC CCAAGCCATG CGCTCTCGGT GGGGAACATG
GTGGT

65

配列番号：8

配列の長さ：51

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTCCGGGAGA CGGTGATGCT GTTGCTGTGC CTGGGGGTCC CGACCGGCAG G

51

配列番号：9

配列の長さ：55

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCTGCCGGTC GGGACCCCCA GGCACAGCAA CAGCATCACC GTCTCCCGGA GTCGA

55

配列番号：10

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CACTGCAGGC AGGCCTTACA ACGTGGACAC TGAGAGC

37

配列番号：11

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCAGAAACCT GTAAATCAGC AG

22

配列番号：12

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCATTTATGC GGAAAGATGT GC

22

配列番号：13

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CGGGATCCGT GAAATAACGT TTGGGTCTT

29

配列番号：14

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCGGAAAAGA TGAATTTACA AC

22

配列番号：15

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTGGGATCCT CTGGACCAGT GGGACAC

27

配列番号：16

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr

1 5 10

配列番号：17

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Gly Pro Glu Ile Leu Glu Val Pro Ser Thr

1 5 10

配列番号：18

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Gly Arg Gly Asp Ser Pro

1

5

配列番号 : 19

配列の長さ : 4675

配列の型 : 核酸

配列

| | |
|---|-----|
| ATG GGG CCA GAA CGG ACA GGG GCC GCG CCG CTG CCG CTG CTG CTG GTG | 48 |
| Met Gly Pro Glu Arg Thr Gly Ala Ala Pro Leu Pro Leu Leu Leu Val | |
| -25 -20 -15 | |
| TTA GCG CTC AGT CAA GGC ATT TTA AAT TGT TGT TTG GCC TAC AAT GTT | 96 |
| Leu Ala Leu Ser Gln Gly Ile Leu Asn Cys Cys Leu Ala Tyr Asn Val | |
| -10 -5 1 | |
| GGT CTC CCA GAA GCA AAA ATA TTT TCC GGT CCT TCA AGT GAA CAG TTT | 114 |
| Gly Leu Pro Glu Ala Lys Ile Phe Ser Gly Pro Ser Ser Glu Gln Phe | |
| 5 10 15 | |
| GGG TAT GCA GTG CAG CAG TTT ATA AAT CCA AAA GGC AAC TGG TTA CTG | 192 |
| Gly Tyr Ala Val Gln Gln Phe Ile Asn Pro Lys Gly Asn Trp Leu Leu | |
| 20 25 30 35 | |
| GTT GGT TCA CCC TGG AGT GGC TTT CCT GAG AAC CGA ATG GGA GAT GTG | 240 |
| Val Gly Ser Pro Trp Ser Gly Phe Pro Glu Asn Arg Met Gly Asp Val | |
| 40 45 50 | |
| TAT AAA TGT CCT GTT GAC CTA TCC ACT GCC ACA TGT GAA AAA CTA AAT | 288 |
| Tyr Lys Cys Pro Val Asp Leu Ser Thr Ala Thr Cys Glu Lys Leu Asn | |
| 55 60 65 | |
| TTG CAA ACT TCA ACA AGC ATT CCA AAT GTT ACT GAG ATG AAA ACC AAC | 336 |
| Leu Gln Thr Ser Thr Ser Ile Pro Asn Val Thr Glu Met Lys Thr Asn | |
| 70 75 80 | |



| | |
|---|-----|
| ATG AGC CTC GGC TTG ATC CTC ACC AGG AAC ATG GGA ACT GGA GGT TTT | 384 |
| Met Ser Leu Gly Leu Ile Leu Thr Arg Asn Met Gly Thr Gly Gly Phe | |
| 85 90 95 | |
| CTC ACA TGT GGT CCT CTG TGG GCA CAG CAA TGT GGG AAT CAG TAT TAC | 432 |
| Leu Thr Cys Gly Pro Leu Trp Ala Gln Gln Cys Gly Asn Gln Tyr Tyr | |
| 100 105 110 115 | |
| ACA ACG GGT GTG TGT TCT GAC ATC AGT CCT GAT TTT CAG CTC TCA GCC | 480 |
| Thr Thr Gly Val Cys Ser Asp Ile Ser Pro Asp Phe Gln Leu Ser Ala | |
| 120 125 130 | |
| AGC TTC TCA CCT GCA ACT CAG CCC TGC CCT TCC CTC ATA GAT GTT GTG | 528 |
| Ser Phe Ser Pro Ala Thr Gln Pro Cys Pro Ser Leu Ile Asp Val Val | |
| 135 140 145 | |
| GTT GTG TGT GAT GAA TCA AAT AGT ATT TAT CCT TGG GAT GCA GTA AAG | 576 |
| Val Val Cys Asp Glu Ser Asn Ser Ile Tyr Pro Trp Asp Ala Val Lys | |
| 150 155 160 | |
| AAT TTT TTG GAA AAA TTT GTA CAA GGC CTT GAT ATA GGC CCC ACA AAG | 624 |
| Asn Phe Leu Glu Lys Phe Val Gln Gly Leu Asp Ile Gly Pro Thr Lys | |
| 165 170 175 | |
| ACA CAG GTG GGG TTA ATT CAG TAT GCC AAT AAT CCA AGA GTT GTG TTT | 672 |
| Thr Gln Val Gly Leu Ile Gln Tyr Ala Asn Asn Pro Arg Val Val Phe | |
| 180 185 190 195 | |
| AAC TTG AAC ACA TAT AAA ACC AAA GAA GAA ATG ATT GTA GCA ACA TCC | 720 |
| Asn Leu Asn Thr Tyr Lys Thr Lys Glu Glu Met Ile Val Ala Thr Ser | |
| 200 205 210 | |
| CAG ACA TCC CAA TAT GGT GGG GAC CTC ACA AAC ACA TTC GGA GCA ATT | 768 |
| Gln Thr Ser Gln Tyr Gly Gly Asp Leu Thr Asn Thr Phe Gly Ala Ile | |
| 215 220 225 | |
| CAA TAT GCA AGA AAA TAT GCC TAT TCA GCA GCT TCT GGT GGG CGA CGA | 816 |
| Gln Tyr Ala Arg Lys Tyr Ala Tyr Ser Ala Ala Ser Gly Gly Arg Arg | |
| 230 235 240 | |

| | |
|---|------|
| AGT GCT ACG AAA GTA ATG GTA GTT GTA ACT GAC GGT GAA TCA CAT GAT | 864 |
| Ser Ala Thr Lys Val Met Val Val Val Thr Asp Gly Glu Ser His Asp | |
| 245 250 255 | |
| GGT TCA ATG TTG AAA GCT GTG ATT GAT CAA TGC AAC CAT GAC AAT ATA | 912 |
| Gly Ser Met Leu Lys Ala Val Ile Asp Gln Cys Asn His Asp Asn Ile | |
| 260 265 270 275 | |
| CTG AGG TTT GGC ATA GCA GTT CTT GGG TAC TTA AAC AGA AAC GCC CTT | 960 |
| Leu Arg Phe Gly Ile Ala Val Leu Gly Tyr Leu Asn Arg Asn Ala Leu | |
| 280 285 290 | |
| GAT ACT AAA AAT TTA ATA AAA GAA ATA AAA GCG ATC GCT AGT ATT CCA | 1008 |
| Asp Thr Lys Asn Leu Ile Lys Glu Ile Lys Ala Ile Ala Ser Ile Pro | |
| 295 300 305 | |
| ACA GAA AGA TAC TTT TTC AAT GTG TCT GAT GAA GCA GCT CTA CTA GAA | 1056 |
| Thr Glu Arg Tyr Phe Phe Asn Val Ser Asp Glu Ala Ala Leu Leu Glu | |
| 310 315 320 | |
| AAG GCT GGG ACA TTA GGA GAA CAA ATT TTC AGC ATT GAA GGT ACT GTT | 1104 |
| Lys Ala Gly Thr Leu Gly Glu Gln Ile Phe Ser Ile Glu Gly Thr Val | |
| 325 330 335 | |
| CAA GGA GGA GAC AAC TTT CAG ATG GAA ATG TCA CAA GTG GGA TTC AGT | 1152 |
| Gln Gly Gly Asp Asn Phe Gln Met Glu Met Ser Gln Val Gly Phe Ser | |
| 340 345 350 355 | |
| GCA GAT TAC TCT TCT CAA AAT GAT ATT CTG ATG CTG GGT GCA GTG GGA | 1200 |
| Ala Asp Tyr Ser Ser Gln Asn Asp Ile Leu Met Leu Gly Ala Val Gly | |
| 360 365 370 | |
| GCT TTT GGC TGG AGT GGG ACC ATT GTC CAG AAG ACA TCT CAT GGC CAT | 1248 |
| Ala Phe Gly Trp Ser Gly Thr Ile Val Gln Lys Thr Ser His Gly His | |
| 375 380 385 | |
| TTG ATC TTT CCT AAA CAA GCC TTT GAC CAA ATT CTG CAG GAC AGA AAT | 1296 |
| Leu Ile Phe Pro Lys Gln Ala Phe Asp Gln Ile Leu Gln Asp Arg Asn | |
| 390 395 400 | |

| | |
|---|------|
| CAC AGT TCA TAT TTA GGT TAC TCT GTG GCT GCA ATT TCT ACT GGA GAA | 1344 |
| His Ser Ser Tyr Leu Gly Tyr Ser Val Ala Ala Ile Ser Thr Gly Glu | |
| 405 410 415 | |
| AGC ACT CAC TTT GTT GCT GGT GCT CCT CGG GCA AAT TAT ACC GGC CAG | 1392 |
| Ser Thr His Phe Val Ala Gly Ala Pro Arg Ala Asn Tyr Thr Gly Gln | |
| 420 425 430 435 | |
| ATA GTG CTA TAT AGT GTG AAT GAG AAT GGC AAT ATC ACG GTT ATT CAG | 1440 |
| Ile Val Leu Tyr Ser Val Asn Glu Asn Gly Asn Ile Thr Val Ile Gln | |
| 440 445 450 | |
| GCT CAC CGA GGT GAC CAG ATT GGC TCC TAT TTT GGT AGT GTG CTG TGT | 1488 |
| Ala His Arg Gly Asp Gln Ile Gly Ser Tyr Phe Gly Ser Val Leu Cys | |
| 455 460 465 | |
| TCA GTT GAT GTG GAT AAA GAC ACC ATT ACA GAC GTG CTC TTG GTA GGT | 1536 |
| Ser Val Asp Val Asp Lys Asp Thr Ile Thr Asp Val Leu Leu Val Gly | |
| 470 475 480 | |
| GCA CCA ATG TAC ATG AGT GAC CTA AAG AAA GAG GAA GGA AGA GTC TAC | 1584 |
| Ala Pro Met Tyr Met Ser Asp Leu Lys Lys Glu Glu Gly Arg Val Tyr | |
| 485 490 495 | |
| CTG TTT ACT ATC AAA AAG GGC ATT TTG GGT CAG CAC CAA TTT CTT GAA | 1632 |
| Leu Phe Thr Ile Lys Lys Gly Ile Leu Gly Gln His Gln Phe Leu Glu | |
| 500 505 510 515 | |
| GGC CCC GAG GGC ATT GAA AAC ACT CGA TTT GGT TCA GCA ATT GCA GCT | 1680 |
| Gly Pro Glu Gly Ile Glu Asn Thr Arg Phe Gly Ser Ala Ile Ala Ala | |
| 520 525 530 | |
| CTT TCA GAC ATC AAC ATG GAT GGC TTT AAT GAT GTG ATT GTT GGT TCA | 1728 |
| Leu Ser Asp Ile Asn Met Asp Gly Phe Asn Asp Val Ile Val Gly Ser | |
| 535 540 545 | |
| CCA CTA GAA AAT CAG AAT TCT GGA GCT GTA TAC ATT TAC AAT GGT CAT | 1776 |
| Pro Leu Glu Asn Gln Asn Ser Gly Ala Val Tyr Ile Tyr Asn Gly His | |
| 550 555 560 | |

| | |
|---|------|
| CAG GGC ACT ATC CGC ACA AAG TAT TCC CAG AAA ATC TTG GGA TCC GAT | 1824 |
| Gln Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Ile Leu Gly Ser Asp | |
| 565 570 575 | |
| GGA GCC TTT AGG AGC CAT CTC CAG TAC TTT GGG AGG TCC TTG GAT GGC | 1872 |
| Gly Ala Phe Arg Ser His Leu Gln Tyr Phe Gly Arg Ser Leu Asp Gly | |
| 580 585 590 595 | |
| TAT GGA GAT TTA AAT GGG GAT TCC ATC ACC GAT GTG TCT ATT GGT GCC | 1920 |
| Tyr Gly Asp Leu Asn Gly Asp Ser Ile Thr Asp Val Ser Ile Gly Ala | |
| 600 605 610 | |
| TTT GGA CAA GTG GTT CAA CTC TGG TCA CAA AGT ATT GCT GAT GTA GCT | 1968 |
| Phe Gly Gln Val Val Gln Leu Trp Ser Gln Ser Ile Ala Asp Val Ala | |
| 615 620 625 | |
| ATA GAA GCT TCA TTC ACA CCA GAA AAA ATC ACT TTG GTC AAC AAG AAT | 2016 |
| Ile Glu Ala Ser Phe Thr Pro Glu Lys Ile Thr Leu Val Asn Lys Asn | |
| 630 635 640 | |
| GCT CAG ATA ATT CTC AAA CTC TGC TTC AGT GCA AAG TTC AGA CCT ACT | 2064 |
| Ala Gln Ile Ile Leu Lys Leu Cys Phe Ser Ala Lys Phe Arg Pro Thr | |
| 645 650 655 | |
| AAG CAA AAC AAT CAA GTG GCC ATT GTA TAT AAC ATC ACA CTT GAT GCA | 2112 |
| Lys Gln Asn Asn Gln Val Ala Ile Val Tyr Asn Ile Thr Leu Asp Ala | |
| 660 665 670 675 | |
| GAT GGA TTT TCA TCC AGA GTA ACC TCC AGG GGG TTA TTT AAA GAA AAC | 2160 |
| Asp Gly Phe Ser Ser Arg Val Thr Ser Arg Gly Leu Phe Lys Glu Asn | |
| 680 685 690 | |
| AAT GAA AGG TGC CTG CAG AAG AAT ATG GTA GTA AAT CAA GCA CAG AGT | 2208 |
| Asn Glu Arg Cys Leu Gln Lys Asn Met Val Val Asn Gln Ala Gln Ser | |
| 695 700 705 | |
| TGC CCC GAG CAC ATC ATT TAT ATA CAG GAG CCC TCT GAT GTT GTC AAC | 2256 |
| Cys Pro Glu His Ile Ile Tyr Ile Gln Glu Pro Ser Asp Val Val Asn | |
| 710 715 720 | |

| | |
|---|------|
| TCT TTG GAT TTG CGT GTG GAC ATC AGT CTG GAA AAC CCT GGC ACT AGC | 2304 |
| Ser Leu Asp Leu Arg Val Asp Ile Ser Leu Glu Asn Pro Gly Thr Ser | |
| 725 730 735 | |
| CCT GCC CTT GAA GCC TAT TCT GAG ACT GCC AAG GTC TTC AGT ATT CCT | 2352 |
| Pro Ala Leu Glu Ala Tyr Ser Glu Thr Ala Lys Val Phe Ser Ile Pro | |
| 740 745 750 755 | |
| TTC CAC AAA GAC TGT GGT GAG GAT GGA CTT TGC ATT TCT GAT CTA GTC | 2400 |
| Phe His Lys Asp Cys Gly Glu Asp Gly Leu Cys Ile Ser Asp Leu Val | |
| 760 765 770 | |
| CTA GAT GTC CGA CAA ATA CCA GCT GCT CAA GAA CAA CCC TTT ATT GTC | 2448 |
| Leu Asp Val Arg Gln Ile Pro Ala Ala Gln Glu Gln Pro Phe Ile Val | |
| 775 780 785 | |
| AGC AAC CAA AAC AAA AGG TTA ACA TTT TCA GTA ACA CTG AAA AAT AAA | 2496 |
| Ser Asn Gln Asn Lys Arg Leu Thr Phe Ser Val Thr Leu Lys Asn Lys | |
| 790 795 800 | |
| AGG GAA AGT GCA TAC AAC ACT GGA ATT GTT GTT GAT TTT TCA GAA AAC | 2544 |
| Arg Glu Ser Ala Tyr Asn Thr Gly Ile Val Val Asp Phe Ser Glu Asn | |
| 805 810 815 | |
| TTG TTT TTT GCA TCA TTC TCC CTA CCG GTT GAT GGG ACA GAA GTA ACA | 2592 |
| Leu Phe Phe Ala Ser Phe Ser Leu Pro Val Asp Gly Thr Glu Val Thr | |
| 820 825 830 835 | |
| TGC CAG GTG GCT GCA TCT CAG AAG TCT GTT GCC TGC GAT GTA GGC TAC | 2640 |
| Cys Gln Val Ala Ala Ser Gln Lys Ser Val Ala Cys Asp Val Gly Tyr | |
| 840 845 850 | |
| CCT GCT TTA AAG AGA GAA CAA CAG GTG ACT TTT ACT ATT AAC TTT GAC | 2688 |
| Pro Ala Leu Lys Arg Glu Gln Gln Val Thr Phe Thr Ile Asn Phe Asp | |
| 855 860 865 | |
| TTC AAT CTT CAA AAC CTT CAG AAT CAG GCG TCT CTC AGT TTC CAA GCC | 2736 |
| Phe Asn Leu Gln Asn Leu Gln Asn Gln Ala Ser Leu Ser Phe Gln Ala | |
| 870 875 880 | |

| | |
|---|------|
| TTA AGT GAA AGC CAA GAA GAA AAC AAG GCT GAT AAT TTG GTC AAC CTC | 2784 |
| Leu Ser Glu Ser Gln Glu Glu Asn Lys Ala Asp Asn Leu Val Asn Leu | |
| 885 890 895 | |
| AAA ATT CCT CTC CTG TAT GAT GCT GAA ATT CAC TTA ACA AGA TCT ACC | 2832 |
| Lys Ile Pro Leu Leu Tyr Asp Ala Glu Ile His Leu Thr Arg Ser Thr | |
| 900 905 910 915 | |
| AAC ATA AAT TTT TAT GAA ATC TCT TCG GAT GGG AAT GTT CCT TCA ATC | 2880 |
| Asn Ile Asn Phe Tyr Glu Ile Ser Ser Asp Gly Asn Val Pro Ser Ile | |
| 920 925 930 | |
| GTG CAC AGT TTT GAA GAT GTT GGT CCA AAA TTC ATC TTC TCC CTG AAG | 2928 |
| Val His Ser Phe Glu Asp Val Gly Pro Lys Phe Ile Phe Ser Leu Lys | |
| 935 940 945 | |
| GTA ACA ACA GGA AGT GTT CCA GTA AGC ATG GCA ACT GTA ATC ATC CAC | 2976 |
| Val Thr Thr Gly Ser Val Pro Val Ser Met Ala Thr Val Ile Ile His | |
| 950 955 960 | |
| ATC CCT CAG TAT ACC AAA GAA AAG AAC CCA CTG ATG TAC CTA ACT GGG | 3024 |
| Ile Pro Gln Tyr Thr Lys Glu Lys Asn Pro Leu Met Tyr Leu Thr Gly | |
| 965 970 975 | |
| GTG CAA ACA GAC AAG GCT GGT GAC ATC AGT TGT AAT GCA GAT ATC AAT | 3072 |
| Val Gln Thr Asp Lys Ala Gly Asp Ile Ser Cys Asn Ala Asp Ile Asn | |
| 980 985 990 995 | |
| CCA CTG AAA ATA GGA CAA ACA TCT TCT TCT GTA TCT TTC AAA AGT GAA | 3120 |
| Pro Leu Lys Ile Gly Gln Thr Ser Ser Ser Val Ser Phe Lys Ser Glu | |
| 1000 1005 1010 | |
| AAT TTC AGG CAC ACC AAA GAA TTG AAC TGC AGA ACT GCT TCC TGT AGT | 3168 |
| Asn Phe Arg His Thr Lys Glu Leu Asn Cys Arg Thr Ala Ser Cys Ser | |
| 1015 1020 1025 | |
| AAT GTT ACC TGC TGG TTG AAA GAC GTT CAC ATG AAA GGA GAA TAC TTT | 3216 |
| Asn Val Thr Cys Trp Leu Lys Asp Val His Met Lys Gly Glu Tyr Phe | |
| 1030 1035 1040 | |

GTT AAT GTG ACT ACC AGA ATT TGG AAC GGG ACT TTC GCA TCA TCA ACG 3264
 Val Asn Val Thr Thr Arg Ile Trp Asn Gly Thr Phe Ala Ser Ser Thr
 1045 1050 1055
 TTC CAG ACA GTA CAG CTA ACG GCA GCT GCA GAA ATC AAC ACC TAT AAC 3312
 Phe Gln Thr Val Gln Leu Thr Ala Ala Ala Glu Ile Asn Thr Tyr Asn
 1060 1065 1070 1075
 CCT GAG ATA TAT GTG ATT GAA GAT AAC ACT GTT ACG ATT CCC CTG ATG 3360
 Pro Glu Ile Tyr Val Ile Glu Asp Asn Thr Val Thr Ile Pro Leu Met
 1080 1085 1090
 ATA ATG AAA CCT GAT GAG AAA GCC GAA GTA CCA ACA GAT CCC GAG 3405
 Ile Met Lys Pro Asp Glu Lys Ala Glu Val Pro Thr Asp Pro Glu
 1095 1100 1105
 CTGCTGGAAG CAGGCTCAGC GCTCCTGCCT GGACGCATCC CGGCTATGCA GCCCCAGTCC 3465
 AGGGCAGCAA GGCAGGCCCC GTCTGCCTCT TCACCCGGAG CCTCTGCCCCG CCCCCTCAT 3525
 GCTCAGGGAG AGGGTCTTCT GGCTTTTTTCC CAGGCTCTGG GCAGGCACAG GCTAGGTGCC 3585
 CCTAACCAG GCCCTGCACA CAAAGGGGCA GGTGCTGGGC TCAGACCTGC CAAGAGCCAT 3645
 ATCCGGGAGG ACCCTGCCCC TGACCTAAGC CCACCCCAA GGCCAAACTC TCCACTCCCT 3705
 CAGCTCGGAC ACCTTCTCTC CTCCAGATT CCAGTAACTC CCAATCTTCT CTCTGCA 3762
 GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA 3807
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1110 1115 1120
 GGTAAGCCAG CCCAGGCCTC GCCCTCCAGC TCAAGGCGGG ACAGGTGCCC TAGAGTAGCC 3867
 TGCATCCAGG GACAGGCCCC AGCCGGGTGC TGACACGTCC ACCTCCATCT CTTCCTCA 3925
 GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA 3973
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1125 1130 1135
 CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG 4021
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 1140 1145 1150

GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC 4069
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 1155 1160 1165
 GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG 4117
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 1170 1175 1180 1185
 CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGG GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC 4165
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 1190 1195 1200
 CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA 4213
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 1205 1210 1215
 GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA 4255
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 1220 1225 1230
 GGTGGGACCC GTGGGGTGCG AGGGCCACAT GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCCTCTGC 4315
 CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC CAACCTCTGT CCTACA GGG CAG CCC CGA GAA CCA 4369
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 1235
 CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG 4417
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 1240 1245 1250
 GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC 4465
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 1255 1260 1265
 GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG 4513
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 1270 1275 1280 1285

| | |
|---|------|
| CCT CCC GTG CTG GAT TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC | 4561 |
| Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu | |
| 1290 1295 1300 | |
| ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC | 4609 |
| Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser | |
| 1305 1310 1315 | |
| GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC | 4657 |
| Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser | |
| 1320 1325 1330 | |
| CTG TCT CCG GGT AAA TGA | 4675 |
| Leu Ser Pro Gly Lys | |
| 1335 | |

配列番号 : 20

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GCTCGAGCAA ACCCAGCGCA ACTACGG

27

配列番号 : 21

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

ATAGTGCCCT GATGACCATT G

21

配列番号 : 22

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GATGGCTTTA ATGATGTGAT TG

22

配列番号 : 23

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

TGTTGGTACT TCGGCTTTCT C

21

配列番号 : 24

配列の長さ : 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 環状

配列の種類 : ペプチド

配列

Cys Ile Pro Glu Leu Ile Val Cys

1

5

配列番号 : 25

配列の長さ : 8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：環状

配列の種類：ペプチド

配列

Cys Met Arg Tyr Thr Ser Ala Cys

1

5

配列番号：26

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：環状

配列の種類：ペプチド

配列

Cys Glu Trp Met Lys Arg Phe Cys

1

5

配列番号：27

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：環状

配列の種類：ペプチド

配列

Cys Tyr Thr Thr Arg Leu Lys Cys

1

5

配列番号：28

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：環状

配列の種類：ペプチド

配列

Cys Leu Arg Tyr Ser Val Pro Cys

1

5

配列番号 : 29

配列の長さ : 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 環状

配列の種類 : ペプチド

配列

Cys Ile Val Asn Arg Leu Gly Cys

1

5.

配列番号 : 30

配列の長さ : 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 環状

配列の種類 : ペプチド

配列

Cys Gly Leu Gln Ala Leu Pro Cys

1

5

配列番号 : 31

配列の長さ : 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 環状

配列の種類 : ペプチド

配列

Cys Lys Leu Lys Gly Thr Met Cys

1

5

請求の範囲

1. インテグリンの α 鎖または β 鎖と、免疫グロブリンの重鎖または軽鎖とからなるキメラ蛋白質。

2. インテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖とからなる請求項1記載のキメラ蛋白質と、インテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖とからなる請求項1記載のキメラ蛋白質が会合してなるキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

3. 請求項1記載のキメラ蛋白質が以下の組み合わせ(1)、(2)、および(3)のいずれかで会合してなる請求項2記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

(1) インテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの重鎖とからなるキメラ蛋白質とインテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの重鎖とからなるキメラ蛋白質が会合してなる α 鎖・免疫グロブリン重鎖- β 鎖・免疫グロブリン重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

(2) インテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの重鎖とからなるキメラ蛋白質とインテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの軽鎖とからなるキメラ蛋白質が会合してなる α 鎖・免疫グロブリン重鎖- β 鎖・免疫グロブリン軽鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

(3) インテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの軽鎖とからなるキメラ蛋白質とインテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの重鎖とからなるキメラ蛋白質が会合してなる α 鎖・免疫グロブリン軽鎖- β 鎖・免疫グロブリン重鎖キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

4. インテグリンの α 鎖が $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ 、 $\alpha 8$ 、 $\alpha 9$ 、 αv 、 αL 、 αM 、 αX 、 $\alpha 11b$ 、または αE である請求項1から3のいずれかに記載のキメラ蛋白質またはキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

5. インテグリンの β 鎖が $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 6$ 、 $\beta 7$ 、または $\beta 8$ である請求項1から3のいずれかに記載のキメラ蛋白質またはキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

6. インテグリンの α 鎖が $\alpha 4$ または $\alpha 2$ であり、 β 鎖が $\beta 1$ である請求項2ま

たは 3 記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

7. インテグリンの $\alpha 4$ と免疫グロブリンの重鎖とからなるキメラ蛋白質が、配列番号 1 のアミノ酸配列で示される請求項 1 から 3 のいずれかに記載のキメラ蛋白質またはキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

8. インテグリンの $\alpha 2$ と免疫グロブリンの重鎖とからなるキメラ蛋白質が、配列番号 19 のアミノ酸配列で示される請求項 1 から 3 のいずれかに記載のキメラ蛋白質またはキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

9. インテグリンの $\beta 1$ と免疫グロブリンの重鎖とからなるキメラ蛋白質が、配列番号 2 のアミノ酸配列で示される請求項 1 から 3 のいずれかに記載のキメラ蛋白質またはキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体。

10. 請求項 1 記載のキメラ蛋白質を暗号化する DNA。

11. インテグリンの α 鎖が $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ 、 $\alpha 8$ 、 $\alpha 9$ 、 αv 、 αL 、 αM 、 αX 、 αIIb 、または αE である請求項 1 記載のキメラ蛋白質を暗号化する DNA。

12. インテグリンの β 鎖が $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 6$ 、 $\beta 7$ 、または $\beta 8$ である請求項 1 記載のキメラ蛋白質を暗号化する DNA。

13. 配列番号 1 または配列番号 19 の塩基配列で示される請求項 11 記載の DNA。

14. 配列番号 2 の塩基配列で示される請求項 12 記載の DNA。

15. 請求項 10 記載の DNA が発現制御配列に機能的に連結されてなる組み換えベクター。

16. 請求項 11 記載の DNA が発現制御配列に機能的に連結されてなる組み換えベクター。

17. 請求項 12 記載の DNA が発現制御配列に機能的に連結されてなる組み換えベクター。

18. 請求項 13 記載の DNA が発現制御配列に機能的に連結されてなる組み換えベクター。

19. 請求項 14 記載の DNA が発現制御配列に機能的に連結されてなる組み換えベクター。

20. インテグリンの α 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖とからなるキメラ



蛋白質を暗号化するDNAが発現制御配列に機能的に連結されてなる組み換えベクターおよびインテグリンの β 鎖と免疫グロブリンの重鎖または軽鎖とからなるキメラ蛋白質を暗号化するDNAが発現制御配列に機能的に連結されてなる組み換えベクターにより同時に形質転換された動物細胞。

21. 請求項16および請求項17記載の組み換えベクターにより同時に形質転換された請求項20記載の動物細胞。

22. 請求項18および請求項19記載の組み換えベクターにより同時に形質転換された請求項20記載の動物細胞。

23. 請求項20記載の動物細胞を培養することを特徴とする請求項2記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体の製造方法。

24. 請求項1から9のいずれかに記載のキメラ蛋白質またはキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体からなる医薬。

25. 請求項1から9のいずれかに記載のキメラ蛋白質またはキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体からなる医薬組成物。

26. 単離した細胞外マトリックスレセプターを有効成分とする血小板代替物。

27. 細胞外マトリックスレセプターが、インテグリンである請求項26記載の血小板代替物。

28. インテグリンの α 鎖が $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ 、 $\alpha 8$ 、 $\alpha 9$ 、 αv 、 αL 、 αM 、 αX 、 αIIb 、または αE である請求項27記載の血小板代替物。

29. インテグリンの β 鎖が $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 、 $\beta 5$ 、 $\beta 6$ 、 $\beta 7$ 、または $\beta 8$ である請求項27記載の血小板代替物。

30. インテグリンがインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ である請求項27記載の血小板代替物。

31. 細胞外マトリックスレセプターが、細胞外マトリックスレセプターと免疫グロブリンとのキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体である請求項26記載の血小板代替物。

32. キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が、インテグリンと免疫グロブリンとのキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体である請求項31記載の血小板代替物。

33. キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が、請求項2記載のキメラ蛋白質ヘテ

ロダイマー複合体である請求項 3 2 記載の血小板代替物。

3 4. キメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体が、請求項 6 記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体である請求項 3 3 記載の血小板代替物。

3 5. 細胞外マトリックスレセプターを担体に結合させて用いることを特徴とする請求項 2 6 から 3 4 のいずれかに記載の血小板代替物。

3 6. 止血能を有することを特徴とする請求項 2 6 から 3 5 のいずれかに記載の血小板代替物。

3 7. インテグリンと免疫グロブリンのキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とリガンドまたは細胞を接触させて混合物を作製した後、リガンドまたは細胞に結合したキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体量もしくはキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体に結合したリガンド量または細胞量を測定することを特徴とする、請求項 2 から 9 のいずれかに記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体とリガンドまたは細胞の結合を試験する方法。

3 8. 請求項 2 から 9 のいずれかに記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を用いてインテグリンに結合する物質を探索する方法。

3 9. 請求項 3 8 記載の方法を用いて得られる、インテグリンに結合する物質。

4 0. 請求項 3 7 記載の方法を用いてインテグリンとリガンドの結合を阻害する物質を探索する方法。

4 1. リガンドが配列番号 3 で示されるフィブロネクチンフラグメント、またはコラーゲンである請求項 4 0 記載の方法。

4 2. 請求項 4 0 または 4 1 記載の方法を用いて得られる、インテグリンとリガンドの結合を阻害する蛋白質、ペプチド、または低分子化合物。

4 3. 請求項 2 から 9 のいずれかに記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を使用することを特徴とするインテグリンのリガンドの量を測定する方法。

4 4. 請求項 2 から 9 のいずれかに記載のキメラ蛋白質ヘテロダイマー複合体を使用することを特徴とする細胞外マトリックス露出部位を同定する方法。

図面

図 1

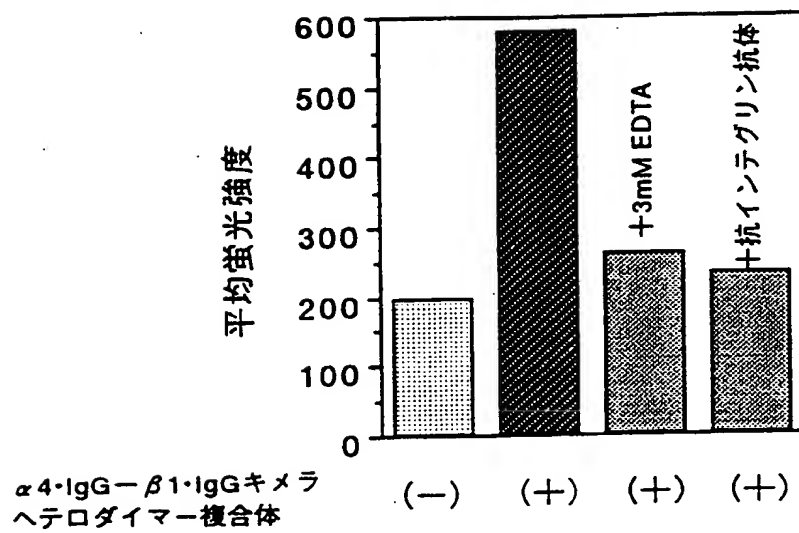
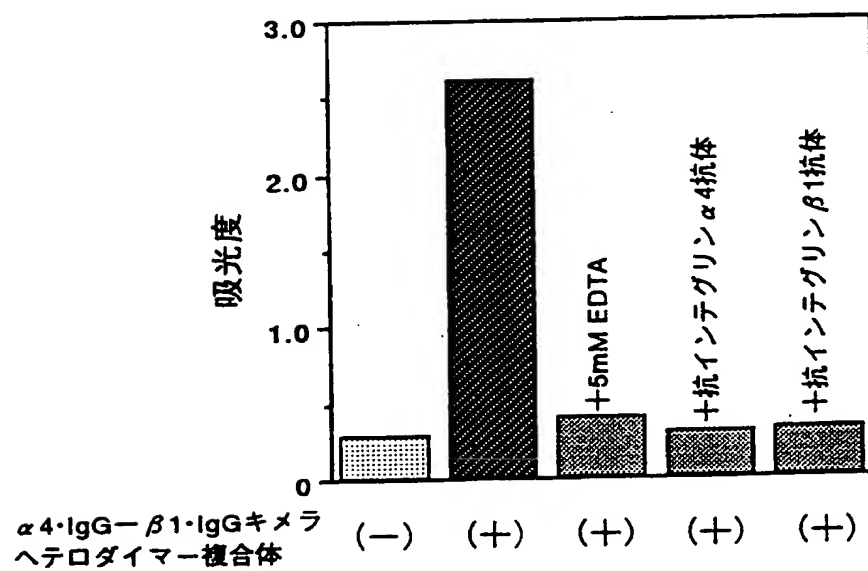


図 2



図面

図 3

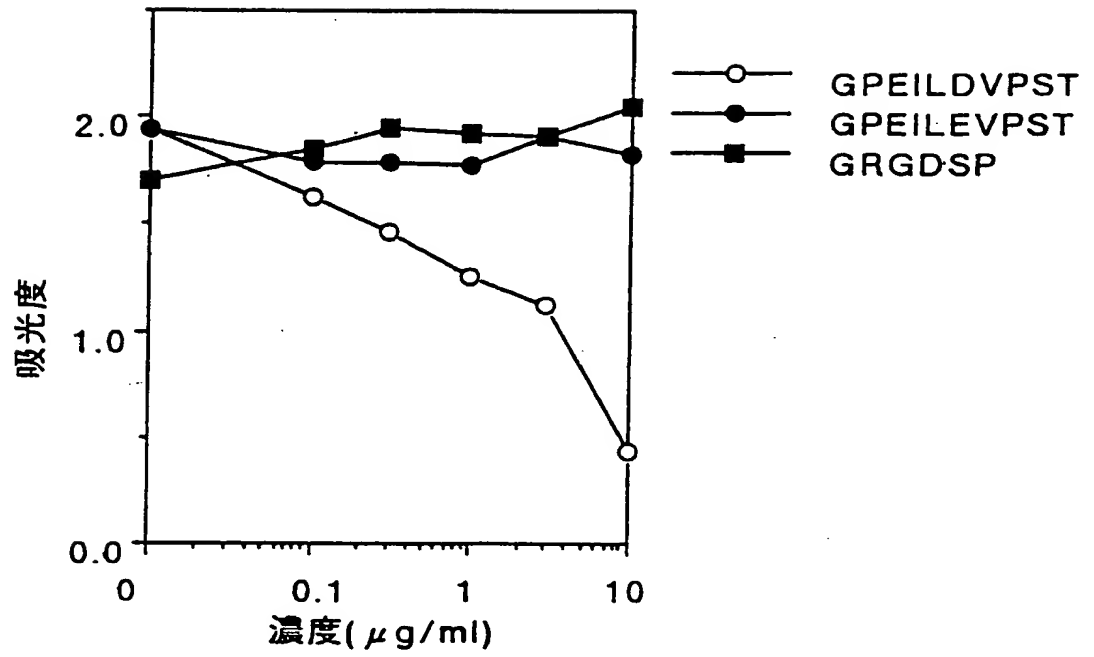
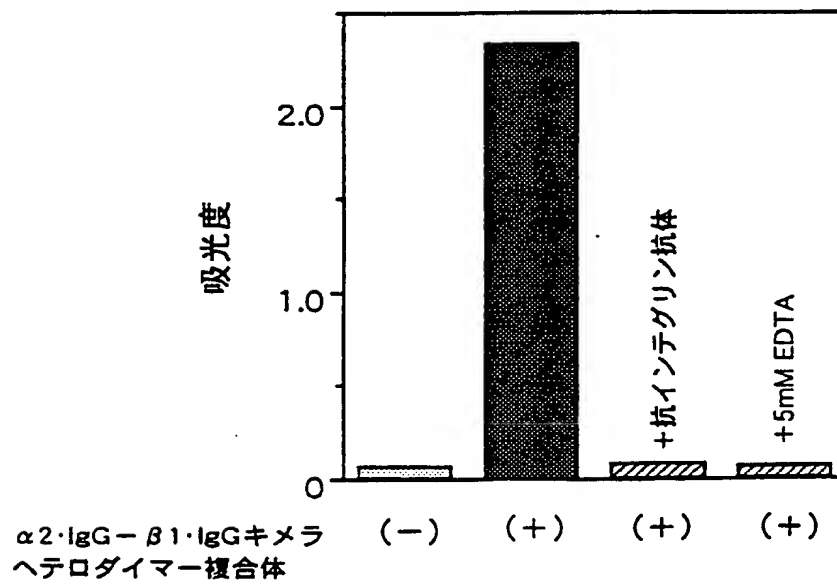


図 4



図面

図 5

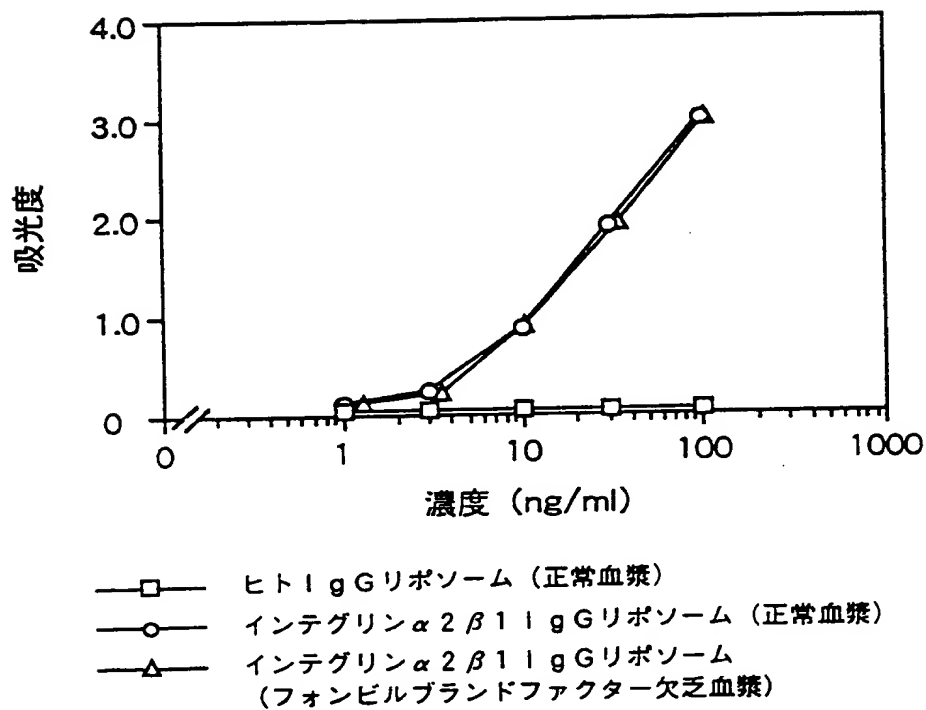
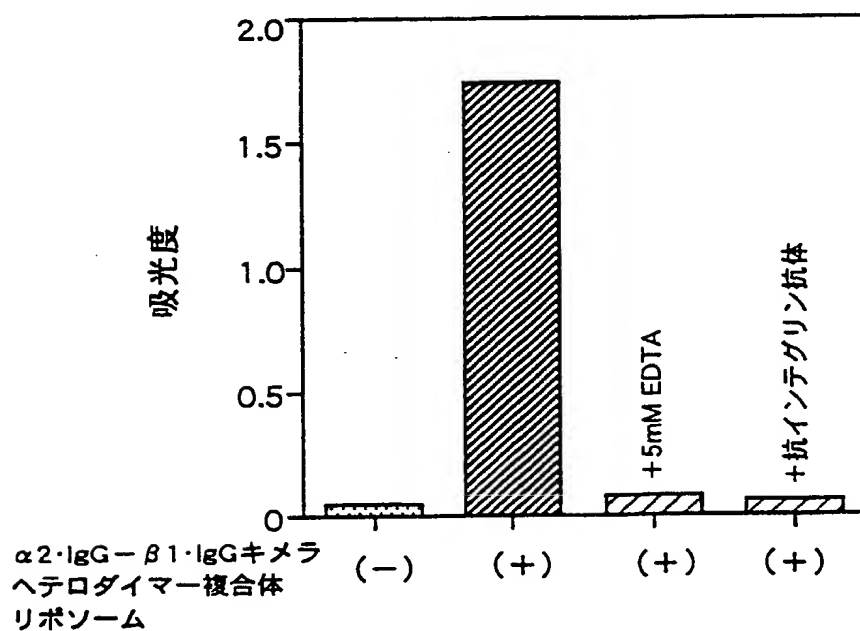


図 6





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00370

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C07K14/705, C12N15/12, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07K14/705, C12N15/12, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DERWENT), WPI (DERWENT), GenBank/EMBL (geneseq)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-------------------------------|
| Y | WO, 92/13559, A1 (PROGENICS PHARMACEUTICALS, INC.), August 20, 1992 (20. 08. 92) & AU, 9214385, A | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | WO, 95/02421, A1 (ALKERMES INC.), January 26, 1995 (26. 01. 95) (Family: none) | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | JP, 6-87899, A (Educational Foundation Fujita Gakuen), March 29, 1994 (29. 03. 94) & EP, 466505, A2 & US, 5475100, A | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | Nucleic Acids Res., Vol. 10, No. 13 (1982) J.W. Ellison et al., "The nucleotide sequence of a human immunoglobulinC _γ gene" p.4071-4079 | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | Cell, Vol. 29, No. 2 (1982) N. Takahashi et al., "Structure of human immunoglobulin gamma genes: implications for evolution of gene family", p.671-679 | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

Date of the actual completion of the international search
June 8, 1998 (08. 06. 98)Date of mailing of the international search report
June 16, 1998 (16. 06. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00370

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-------------------------------|
| Y | EMBO J., Vol. 8, No. 5 (1989) Y. Takada et al., "The primary structure of the α^4 subunit of VLA-4: homology to other integrins and a possible cell-cell adhesion function", p.1361-1368 | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | Mol. Immunol., Vol. 32 (1995) M.C. Szabo et al., "Identification of two variants of the human integrin α_4 subunit", p.1453-1454 | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | J. Cell Biol. Vol. 105 (1987) W.S. Argraves et al., "Amino acid sequence of the human fibronectin receptor", p.1183-1190 | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | US, 5516634, A (Newman P.J.), May 14, 1996 (14. 05. 96) (Family: none) | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | J. Cell Biol., Vol. 109 (1989) Y. Takada et al., "The primary structure of the VLA-2/collagen receptor α^2 subunit (platelet GPIa): homology to other integrins and the presence of a possible collagen-binding domain", p.397-407 | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | J. Clin. Invest., Vol. 92 (1993) S. Santoso et al., "The human platelet alloantigens Br ^a and Br ^b are associated with a single amino acid polymorphism on glycoprotein Ia (Integrin subunit α^2)", p.2427-2432 | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| X/Y | JP, 7-500721, A (The Regents of the University of California), January 26, 1995 (26. 01. 95) & WO, 92/12236, A1 | 39/37-38, 43, 44 |
| X/Y | JP, 5-505179, A (La Jolla Cancer Research Foundation), August 5, 1993 (05. 08. 93) & WO, 91/09874, A & EP, 507836, A & US, 5169930, A | 39/37-38, 43, 44 |
| Y | JP, 5-502228, A (Scripps Clinic & Research Foundation), April 22, 1993 (22. 04. 93) & WO, 91/07977, A & EP, 502124, A & US, 5196511, A | 26-36, 42 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C 07 K 14 / 705, C 12 N 15 / 12, G 01 N 33 / 50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C 07 K 14 / 705, C 12 N 15 / 12, G 01 N 33 / 50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DERWENT), WPI (DERWENT), GenBank/EMBL (gene seq)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|-------------------------------|
| Y | WO, 92/13559, A1 (PROGENICS PHARMACEUTICALS, INC.) 20.8月.1992(20.08.92) & AU, 9214385, A | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | WO, 95/02421, A1 (ALKERMES INC.) 26.1月.1995(26.01. 95) (ファミリーなし) | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | JP, 6-87899, A (学校法人藤田学園) 29.3月.1994 (29.03.94) & EP, 466505, A2 & US, 5475100, A | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | Nucleic Acids Res., Vol. 10, No. 13(1982) J. W. Ellison et al; "The nucleotide sequence of a human immunoglobulin C _μ gene" p. 4071-4079 | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.06.98

国際調査報告の発送日

16.06.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝本 晶子

4B

9452

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|-------------------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | Cell, Vol. 29, No. 2 (1982) N. Takahashi et al. ; "Structure of human immunoglobulin gamma genes: implications for evolution of gene family", p. 671-679 | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | EMBO J., Vol. 8, No. 5 (1989) Y. Takada et al. : "The primary structure of the α^4 subunit of VLA-4: homology to other integrins and a possible cell-cell adhesion function", p. 1361-1368 | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | Mol. Immunol., Vol. 32 (1995) M. C. Szabo et al. ; "Identification of two variants of the human integrin α_4 subunit", p. 1453-1454 | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | J. Cell Biol. Vol. 105 (1987) W. S. Argraves et al. ; "Amino acid sequence of the human fibronectin receptor", p. 1183-1190 | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | US, 5 5 1 6 6 3 4, A (Newman P. J.) 14. 5月. 1996 (14. 05. 96) (ファミリーなし) | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | J. Cell Biol., Vol. 109 (1989) Y. Takada et al. ; "The primary structure of the VLA-2/collagen receptor α^2 subunit (platelet GPIa): homology to other integrins and the presence of a possible collagen-binding domain", p. 397-407 | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| Y | J. Clin. Invest., Vol. 92 (1993) S. Santoso et al. ; "The human platelet alloantigens Br ^a and Br ^b are associated with a single amino acid polymorphism on glycoprotein Ia (Integrin subunit α_2)", p. 2427-2432 | 1-25, 26-34, 37-38, 40, 41 |
| X/Y | J P, 7-500721, A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニヴァーシティー オブ カリフォルニア) 26. 1月. 1995 (26. 01. 95) & WO, 92/12236, A 1 | 39/37-38, 43, 44 |
| X/Y | J P, 5-505179, A (ラ ホヤ キャンサー リサーチ ファウンデーション) 5. 8月. 1993 (05. 08. 93) & WO, 91/09874, A & EP, 507836, A & US, 5169930, A | 39/37-38, 43, 44 |
| Y | J P, 5-502228, A (スクリップス クリニック アンド リサーチ ファウンデーション) 22. 4月. 1993 (22. 04. 93) & WO, 91/07977, A & EP, 502124, A & US, 5196511, A | 26-36, 42 |